

**PRODUCTION DE CHITOSANASES MODULAIRES
MUNIES D'UN SITE D'ATTACHEMENT À LA CELLULOSE
ET ÉTUDE DE LEUR ACTIVITÉ EN BIORÉACTEUR**

par

Bertrand Plouffe

**MÉMOIRE présenté au département de biologie
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)**

**Faculté des Sciences
Université de Sherbrooke**

Sherbrooke, Québec, Canada, décembre 1997



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-35704-X

Le 7 mai 1998, le jury suivant a accepté ce mémoire dans sa version finale.
date

Président-rapporteur: M. Brian Talbot
Département de biologie

Membre: Mme Christine Moresoli
Faculté des sciences appliquées

Membre: M. Ryszard Brzezinski
Département de biologie

SOMMAIRE

Cinq gènes de fusion ont été créés par manipulations génétiques. Ces gènes codent pour des chitosanases modulaires munies d'un domaine d'attachement à la cellulose. Ces cinq gènes ont été nommés *csn-g-xbd*, *csn-g-cbd_{Cex}*, *csn-pt-cbd_{Cex}*, *csn-neg-cbd_{Cex}* et *csn-pos-cbd_{Cex}*.

Tous ces gènes, de même que le gène *csn-cbd_{Cex}* obtenu lors de travaux précédents, ont été exprimés dans l'actinomycète *Streptomyces lividans* TK24.

L'analyse des protéines extracellulaires produites par les souches transformées démontre que les gènes de fusion sont exprimés par *S. lividans* mais que la majorité (environ 60 à 99%) des peptides produits ont une masse moléculaire apparente (évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS dénaturant) comparable à la masse du module catalytique CSN seul. Il est donc suggéré que les enzymes modulaires sont clivées sous l'action des protéases endogènes du microorganisme producteur. L'expression des gènes *csn-g-xbd* et *csn-cbd_{Cex}* a mené aux meilleurs taux de production d'enzymes de fusion dont la masse apparente est voisine de la masse attendue pour ces enzymes dans leur forme complète.

Malgré une faible production d'enzymes modulaires intactes, ces dernières ont pu être immobilisées par simple contact des surnageants de cultures avec de la cellulose microcristalline. L'activité des enzymes immobilisées a été étudiée à l'intérieur de bioréacteurs de type colonne (ou à lit fluidisé) utilisés en continu. Il a été observé que toutes les enzymes, une fois immobilisées, demeurent actives sur le chitosane de haut poids moléculaires en solution. Il a aussi été observé que le degré d'hydrolyse varie en fonction du débit de la solution de chitosane à travers les bioréacteurs. Aucune fuite d'enzyme n'a pu être détectée lors de l'utilisation des bioréacteurs. L'inactivation des enzymes immobilisées suit une cinétique exponentielle. Des demi-vies de l'ordre de dizaines de jours ont été observées à 37°C pour les enzymes CSN-G-XBD, CSN-CBD_{Cex} et CSN-PT-CBD_{Cex}. Des essais à 45°C ont montré des demi-vies de l'ordre de quelques jours pour les enzymes CSN-PT-CBD_{Cex} et CSN-G-CBD_{Cex}.

Ces résultats ont permis de prouver la faisabilité technique d'un procédé d'hydrolyse du chitosane à l'aide de chitosanases modulaires immobilisées.

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent à ma compagne Isabelle Ménard pour l'aide, les conseils et le soutien qu'elle m'a apporté tout au long de ce projet.

Seconds mais non moindres, mes remerciements le plus sincères s'adressent au docteur Ryszard Brzezinski pour la qualité et la fraternité de sa direction.

Je remercie vivement mes conseillers, les docteurs Christine Moresoli et Brian Talbot, pour leurs conseils judicieux et leur supervision de ce mémoire.

J'aimerais également remercier tous mes collègues de travail du laboratoire et du département de biologie pour l'ensemble des discussions et interactions que nous avons entretenues. Ces petits éléments journaliers ont grandement influencés la qualité de mon séjour et de ma formation.

Je remercie ma famille et mes amis pour leur intérêt vis à vis de ma démarche, et leur aide lorsque c'était le temps de "décrocher" et de s'amuser.

Mes derniers remerciements, et non les moindres, sont adressés au Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche pour la bourse de maîtrise qui m'a été accordée.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

1.1 La chitine et le chitosane.....	1
1.2 Applications du chitosane.....	4
1.3 Le chitosane oligomérique.....	5
1.4 Hydrolyse du chitosane.....	8
1.5 Les domaines d'attachement à la cellulose.....	11
1.6 Construction de gènes modulaires codant pour des chitosanases munies d'un domaine d'attachement.....	13
1.7 Système modulaire.....	15

CHAPITRE 2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Manipulations génétiques	
2.1.1 Souches bactériennes.....	17
2.1.2 Plasmides et oligonucléotides.....	18
2.1.3 Milieux de culture.....	28
2.1.4 Préparation et transformation de <i>E. coli</i> compétentes.....	28
2.1.5 Extraction d'ADN plasmidique de <i>E. coli</i>	28
2.1.6 Traitements enzymatiques des ADN.....	29
2.1.7 Appariement des oligonucléotides complémentaires.....	29

2.1.8	Mutagenèse in vitro dirigée par oligonucléotides.....	30
2.1.9	Analyse sur gel d'agarose.....	30
2.1.10	Séquençage.....	31
2.2	Production des enzymes de fusion	
2.2.1	Souches bactériennes.....	32
2.2.2	Milieux de culture.....	32
2.2.3	Préparation et transformation de protoplastes de <i>S. lividans</i> TK24.....	34
2.2.4	Production et purification des protéines de fusion.....	34
2.2.5	Dosage des protéines.....	35
2.2.6	Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide-SDS.....	35
2.2.7	Dosage de l'activité chitosanolytique.....	35
2.3	Étude de l'activité enzymatique en bioréacteur	
2.3.1	Immobilisation des enzymes de fusion sur la cellulose.....	36
2.3.2	Montage des bioréacteurs de type colonne.....	36
2.3.3	Dosage des sucres réducteurs des solutions de chitosane.....	38
2.3.4	Analyse préliminaire par chromatographie liquide à haute pression (HPLC).....	38

CHAPITRE 3 – RÉSULTATS

3.1 Constructions génétiques

3.1.1	Construction du plasmide pBP251, porteur du gène de fusion <i>csn-g-xbd</i>	39
3.1.1.1	Construction du plasmide pBP151.....	41
3.1.1.2	Construction du plasmide pBP251.....	41

3.1.2	Construction du plasmide pBP201, porteur du gène de fusion	
	<i>csn-g-cbd_{Cex}</i>	48
3.1.2.1	Mutagenèse dirigée de pALTER390.....	49
3.1.2.2	Construction du plasmide pBP200B.....	52
3.1.2.3	Mutagenèse dirigée de pBP151.....	52
3.1.2.4	Construction du plasmide pBP201.....	55
3.1.3	Construction du plasmide pBP202, porteur du gène de fusion	
	<i>csn-pt-cbd_{Cex}</i>	58
3.1.3.1	Construction du plasmide intermédiaire pUC19 <i>csnB-cbd_{Cex}</i>	58
3.1.3.2	Construction du plasmide pUC19 <i>csn-pt-cbd_{Cex}</i>	60
3.1.3.3	Séquençage partiel de pUC19 <i>csn-pt-cbd_{Cex}</i>	61
3.1.3.4	Transfert du gène de fusion <i>csn-pt-cbd_{Cex}</i> dans le plasmide pFD666.....	61
3.1.4	Construction du plasmide pBP203, porteur du gène de fusion	
	<i>csn-neg-cbd_{Cex}</i>	65
3.1.4.1	Construction du plasmide pUC19 <i>csn-neg-cbd_{Cex}</i>	66
3.1.4.2	Transfert du gène de fusion <i>csn-neg-cbd_{Cex}</i> dans le plasmide pALTER.....	66
3.1.4.3	Séquençage partiel de pBP103.....	67
3.1.4.4	Transfert du gène de fusion <i>csn-neg-cbd_{Cex}</i> dans le plasmide pFD666.....	67
3.1.5	Construction du plasmide pBP204, porteur du gène de fusion	
	<i>csn-pos-cbd_{Cex}</i>	71
3.1.5.1	Construction du plasmide pUC19 <i>csn-pos-cbd_{Cex}</i>	72

3.1.5.2	Transfert du gène de fusion <i>csn-pos-cbd_{Cex}</i> dans le plasmide pALTER.....	72
3.1.5.3	Séquençage partiel de pBP104.....	73
3.1.5.4	Transfert du gène de fusion <i>csn-pos-cbd_{Cex}</i> dans le plasmide pFD666.....	73
3.2	Expression des gènes de fusion dans <i>S. lividans</i> TK24	
3.2.1	Détection de l'expression des gènes de fusion sur milieu de culture solide chitosane-agar.....	78
3.2.2	Production des enzymes de fusion en milieu de culture chitosane liquide.....	78
3.2.3	Électrophorèse des protéines totales sur gels de polyacrylamide- SDS dénaturant.....	84
3.3	Étude des enzymes de fusion en bioréacteur	
3.3.1	Évaluation du volume mort des colonnes.....	90
3.3.2	Étude du niveau d'hydrolyse en fonction du débit du substrat....	91
3.3.3	Stabilité des enzymes en bioréacteur.....	94
3.3.4	Analyse préliminaire des hydrolysats de chitosane par HPLC.....	100
CHAPITRE 4 - DISCUSSION		
4.1	Constructions génétiques.....	102
4.2	Expression des gènes de fusion dans <i>S. lividans</i> TK24.....	104
4.3	Études des enzymes modulaires en bioréacteur.....	107
CONCLUSION.....		109
ANNEXE 1.....		110
ANNEXE 2.....		117

BIBLIOGRAPHIE.....	119
--------------------	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a.	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
BSA	albumine de sérum bovin
CBD	domaine d'attachement à la cellulose
cm	centimètre
db	double brins
dNTP	désoxynucléotide
°C	degré Celsius
Ci	Curie
g	gramme
h	heure
HPLC	chromatographie liquide à haute pression
IgG	immunoglobuline
J	jour
kDa	kilodalton
l	litre
LB	Luria-Bertani
M	molaire
mCi	milli-Curie
min.	minute
mg	milligramme
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
mol.	mole
MCS	site de clonage multiple

n°	numéro
nm	nanomètre
OFA ⁺	One For All ⁺
pb	paire de base
pMol.	picomole
Q	débit
rpm	rotation par minute
sb	simple brin
US	devise américaine
V	volume
U	unité d'activité enzymatique
μg	microgramme
μl	microlitre
μm	micromètre
μMol.	micromole
θ _H	temps de résidence

LISTE DES TABLEAUX

2.1	Sommaire des souches d' <i>Escherichia coli</i> utilisées.....	17
2.2	Origine plasmidique des modules génétiques utilisés.....	18
2.3	Séquence des oligonucléotides.....	19
2.4	Résumé de l'utilisation des oligonucléotides.....	20
3.1	Poids calculé des protéines de fusion matures.....	84

LISTE DES FIGURES

1.1	Structure de la chitine et du chitosane.....	2
1.2	Principales étapes de préparation de la chitine et du chitosane à partir de carapaces de crustacés.....	3
1.3	Organisation modulaire des gènes de fusion.....	16
2.1	Carte physique du plasmide pALTER.....	21
2.2	Carte physique du plasmide pUC19.....	22
2.3	Carte physique du vecteur navette pFD666.....	23
2.4	Carte physique du plasmide pALTER- <i>csnB</i>	24
2.5	Carte physique du plasmide pALTER390.....	25
2.6	Carte physique du plasmide pTZ18R:XlnB.....	26
2.7	Carte physique du plasmide pIJ680-PT-CBD _{Cex}	27
2.8	Représentation schématique du montage d'un bioréacteur de type colonne....	37
3.1	Construction du plasmide pBP251, porteur du gène de fusion <i>csn-g-xbd</i>	40
3.2	Analyse du patron de restriction du clone candidat à la construction de pBP151.....	43
3.3	Carte physique du plasmide pBP151.....	44
3.4	Analyse du patron de restriction du clone candidat à la construction de pBP251.....	45
3.5	Carte physique du plasmide pBP251.....	46
3.6	Séquence génétique du gène de fusion <i>csn-g-xbd</i> et séquence d'acides aminés déduite.....	47
3.7	Construction du plasmide pBP201, porteur du gène de fusion <i>csn-g-cbd</i> _{Cex}	48
3.8	Analyse du patron de restriction du clone candidat à la construction de pBP100B.....	51

3.9	Analyse du patron de restriction du clone candidat à la construction de pBP151N.....	54
3.10	Carte physique du plasmide pBP201.....	56
3.11	Séquence génétique du gène de fusion <i>csn-g-cbd_{Cex}</i> et séquence d'acides aminés déduite.....	57
3.12	Construction du plasmide pBP202.....	59
3.13	Carte physique du plasmide pBP202.....	63
3.14	Séquence génétique du gène de fusion <i>csn-pt-cbd_{Cex}</i> et séquence d'acides aminés déduite.....	64
3.15	Étapes de construction du plasmide pBP203, porteur du gène de fusion <i>csn-neg-cbd_{Cex}</i>	65
3.16	Carte physique du plasmide pBP203.....	69
3.17	Séquence génétique du gène de fusion <i>csn-neg-cbd_{Cex}</i> et séquence d'acides aminés déduite.....	70
3.18	Construction du plasmide pBP204, porteur du gène de fusion <i>csn-pos-cbd_{Cex}</i>	71
3.19	Autoradiographie du gel de séquençage partiel de pBP104.....	75
3.20	Carte physique du plasmide pBP204.....	76
3.21	Séquence génétique du gène de fusion <i>csn-pos-cbd_{Cex}</i> et séquence d'acides aminés déduite.....	77
3.22	Détection de l'activité chitosanolytique des souches recombinantes sur milieux de culture solide agar-chitosane.....	81
3.23	Suivis des cultures de A) <i>S. lividans</i> TK24 (pBP201) et B) <i>S. lividans</i> TK24 (pBP251) cultivées en erlenmeyers de 4 l.....	82
3.24	Suivi de la culture de <i>S. lividans</i> TK24 (pBP202) en bioréacteur automatisé.	83
3.25	Électrophorèse, sur gel de polyacrylamide-SDS dénaturant, des protéines totales contenues dans les surnageants de culture de A) <i>S. lividans</i> TK24 (pATS390) et B) <i>S. lividans</i> TK24 (pBP251).....	85

3.26	Électrophorèse, sur gel de polyacrylamide-SDS dénaturant, des protéines totales contenues dans les surnageants des cultures de A) <i>S. lividans</i> TK24 (pBP201), B) <i>S. lividans</i> TK24 (pBP202) et C) <i>S. lividans</i> TK24 (pBP204)...	86
3.27	Électrophorèse, sur gel de polyacrylamide-SDS dénaturant, des protéines totales contenues dans le surnageant de la culture de <i>S. lividans</i> TK24 (pBP203).....	87
3.28	Détermination du volume mort des colonnes.....	90
3.29	Variation du degré d'hydrolyse en fonction du débit appliqué pour les enzymes A) CSN-PT-CBD _{Cex} et B) CSN-G-XBD.....	93
3.30	Estimation de la stabilité enzymatique : représentation exponentielle pour les enzymes A) CSN-PT-CBD _{Cex} et B) CSN-G-XBD à 37°C.....	95
3.31	Estimation de la stabilité enzymatique : représentation semi-logarithmique pour les enzymes A) CSN-PT-CBD _{Cex} et B) CSN-G-XBD à 37°C.....	96
3.32	Estimation de la stabilité de l'enzyme CSN-PT-CBD _{Cex} à 45°C.....	98
3.33	Estimation de la stabilité des enzymes A) CSN-G-CBD _{Cex} et B) CSN-G-XBD à 55°C.....	99
3.34	Résultats préliminaires d'analyse par chromatographie en phase liquide à haute pression.....	101
A-1	Carte physique du plasmide pBP200B.....	110
A-2	Carte physique du plasmide pUC19 _{csnB-cbd} _{Cex}	111
A-3	Carte physique du plasmide pUC19 _{csn-pt-cbd} _{Cex}	112
A-4	Carte physique du plasmide pUC19 _{csn-neg-cbd} _{Cex}	113
A-5	Carte physique du plasmide pBP103.....	114
A-6	Carte physique du plasmide pUC19 _{csn-pos-cbd} _{Cex}	115
A-7	Carte physique du plasmide pBP104.....	116
A-8	Séquence génétique du gène de fusion <i>csn-cbd</i> et séquence d'acides aminés déduite.....	117

A-9	Séquence génétique du gène de fusion <i>csnB-cbd</i> et séquence d'acides aminés déduite.....	118
-----	---	-----

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 La chitine et le chitosane

La chitine est un polysaccharide linéaire formé d'unités de N-acétyl-glucosamines liées entres elles par des liens glycosidiques de type β -1,4. C'est le deuxième polymère le plus abondant dans la nature après la cellulose. Le chitosane est un dérivé partiellement ou totalement déacétylé de la chitine. Les structures de ces deux molécules sont présentées à la figure 1.1.

La chitine se retrouve naturellement dans les téguments d'insectes, de nématodes et d'invertébrés marins. On en retrouve également dans la paroi cellulaire de certaines algues et dans les parois de champignons. La principale source de chitine exploitée commercialement demeure néanmoins les carapaces d'invertébrés marins qui sont fournis en grandes quantités par l'industrie de la transformation alimentaire des crustacés. Pour ces industries, les téguments sont un véritable déchet et leur utilisation est une forme de revalorisation de la biomasse.

Les champignons utilisés par l'industrie des fermentations sont une deuxième source de chitine exploitée commercialement. Ces industries de fermentation produisent, entre autre, des antibiotiques et de l'acide citrique. Dans ce cas, la chitine est extraite des parois des microorganismes après leur utilisation en fermenteur. Il s'agit donc d'un autre exemple de revalorisation de la biomasse.

De son côté, le chitosane est retrouvé naturellement dans la paroi des zygomycètes (une division du règne des champignons), la paroi de certaines algues vertes et, de façon temporaire, dans la carapace d'arthropodes (insectes, crustacés, etc.) lors de leur mue.

Néanmoins, la principale source de chitosane demeure la chitine que l'on traite chimiquement par hydrolyse basique.

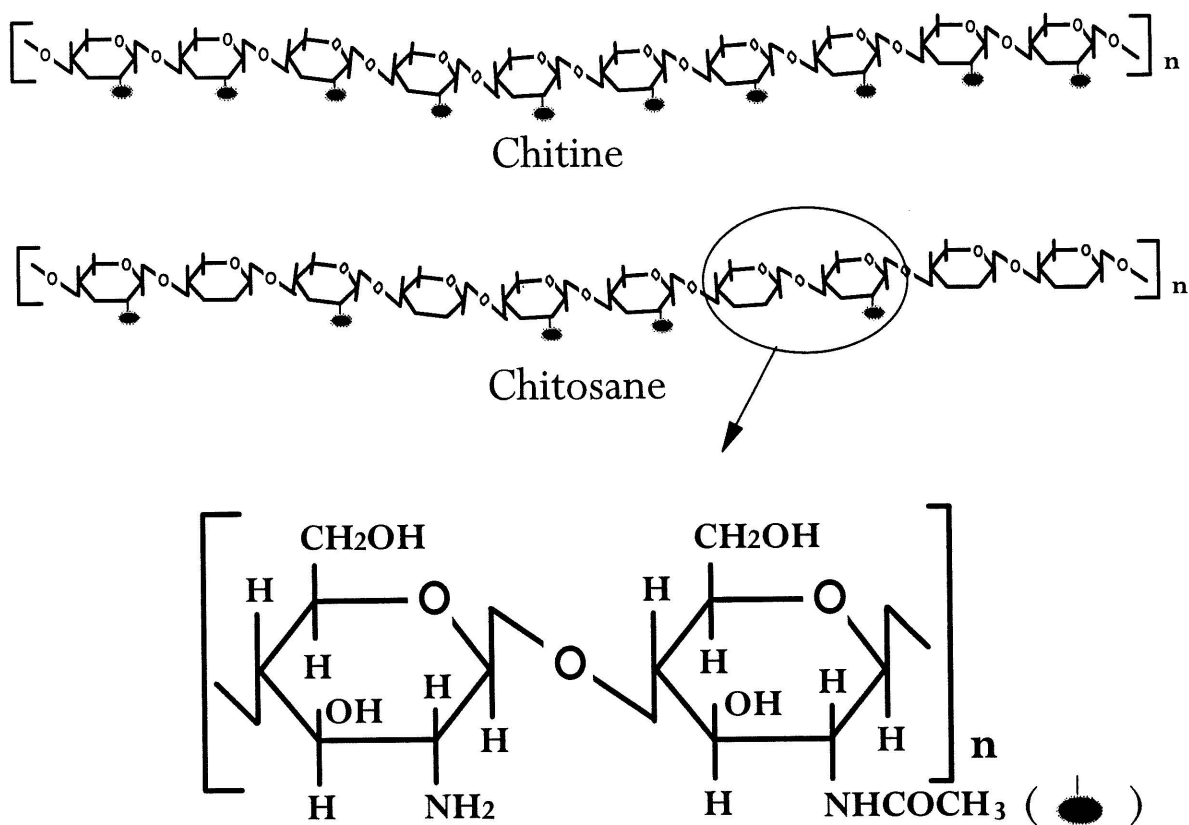


Figure 1.1: Structure de la chitine et du chitosane. Les liens glycosidiques sont de type β -1,4. Dans la chitine, tous les résidus sont acétylés (COCH_3) sur leur carbone n°2. Dans le cas du chitosane seulement une partie des résidus sont acétylés à cette même position. On note également la présence de groupements alcool (OH) sur les carbones n°3 et n°6, tant pour la chitine que pour le chitosane. Également, les résidus non acétylés du chitosane présentent un groupement amine (NH_2) sur leur carbone n°2. La lettre "n" indique que ces chaînes sont de longueurs variées (de 2 à plus de 1000 unités).

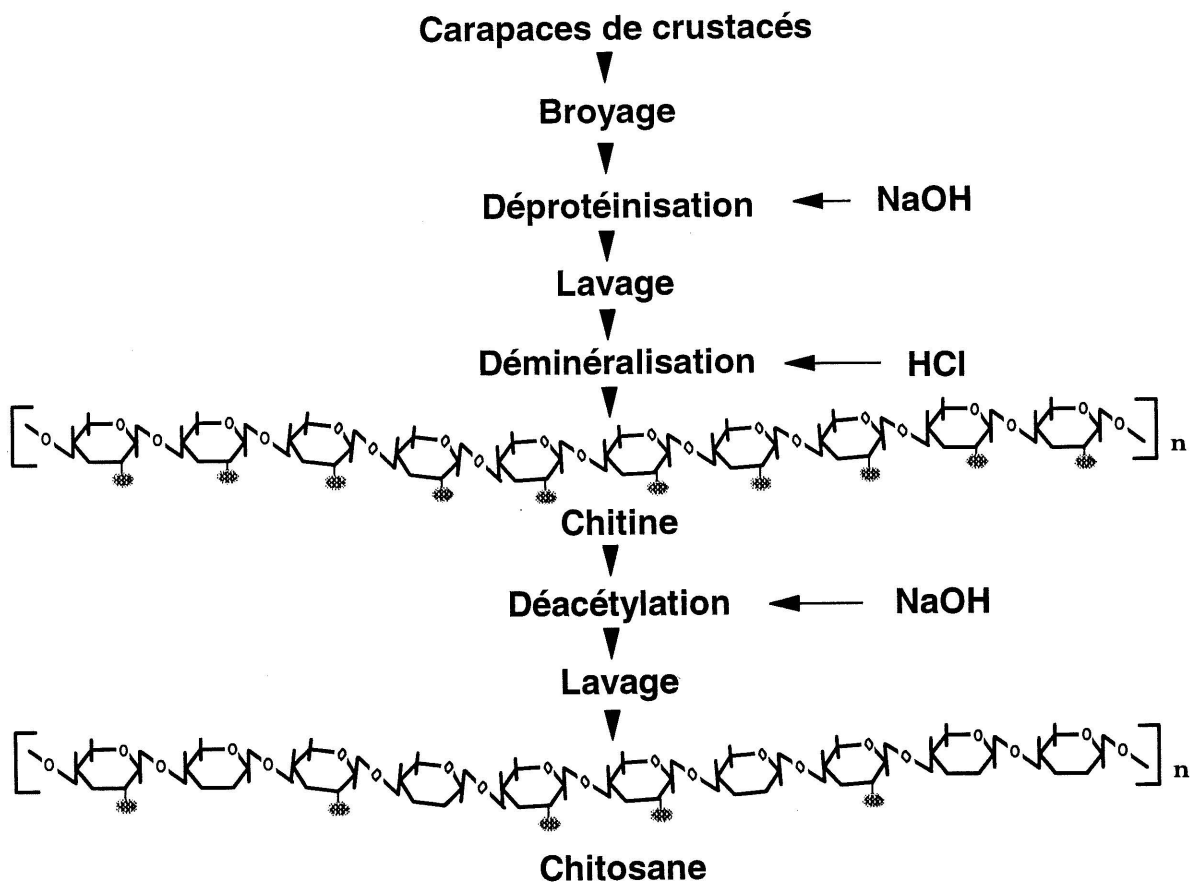


Figure 1.2: Principales étapes de préparation de la chitine et du chitosane à partir de carapaces de crustacés.

Les principales étapes qui mènent à l'extraction de la chitine et à sa transformation en chitosane sont présentées à la figure 1.2.

Le chitosane est soluble en solution aqueuse légèrement acide. Dans cet état, il est chargé positivement. De plus chacun des résidus qui compose le polymère possède deux groupements OH et les résidus déacétylés possèdent également un groupement NH₂. Ces groupements peuvent être substitués par voies chimiques de façon à obtenir du chitosane modifié (Hirano, 1997).

1.2 Applications du chitosane

Le chitosane, dans ses états naturel et modifié, possède plusieurs applications potentielles. Dans le domaine de la culture des végétaux (domaine agricole, horticole, etc.), plusieurs études démontrent l'induction des mécanismes de défense, tant locaux que systémiques, chez les plantes traitées à l'aide de chitosane. Différents traitements ont été étudiés, par exemple: l'applications de chitosane sur les semences (Benhamou et al., 1994), dans le milieu de germination (Li et al., 1995), directement sur les plantes (Lafontaine et Benhamou, 1996) ou encore dans des cultures de cellules végétales en suspensions (Popp et al., 1996). Les différents types de mécanismes de défense induits comprennent: la production de phytoalexines (Kuchitsu et al., 1997 ; Akiyama et al., 1995); la production de protéines reliées à la pathogénèse, telles des chitinases, chitosanase et beta-1,3 glucanases acides (Li et al., 1995 ; Wu et al., 1997) et la production d'éthylène (Popp et al., 1996).

Le chitosane est aussi utilisé comme agent coagulant dans le traitement des eaux usées, principalement dans le domaine de la transformation alimentaire (Pinotti, 1997).

Dans le domaine médical, on exploite les propriétés cicatrisantes du chitosane en l'utilisant dans la confection de fils de suture, de peaux artificielles et de lentilles cornéennes. On utilise également des chitosanes modifiés pour favoriser la régénération des os (Muzzarelli et al., 1997).

En pharmacologie, le chitosane est utilisé dans la confection de capsules et d'éponges permettant un relâchement graduel des agents médicamenteux ou encore après que ceux-ci aient franchi l'environnement acide de l'estomac. (Chen et Tsaih, 1997 ; Tozaki et al, 1997 ; Oungbho et Muller, 1997).

Dans le domaine du textile quelques applications sont bien développées. Celles-ci exploitent l'activité anti-microbienne, la biocompatibilité et la biodégradabilité des fibres de chitosane

dans la confection de vêtements et de pansements. On utilise également le chitosane pour éliminer les colorants lors du traitement des eaux usées de cette même industrie (Hudson, 1997).

Zhang et Quantick (1997) proposent également d'appliquer du chitosane sur les fruits pour ralentir leur brunissement et leur pourrissement.

Voilà donc quelques applications du chitosane qui sont étudiées ou exploitées à ce jour. Évidemment cette liste est non exhaustive et de nouvelles applications restent encore à être imaginées et développées.

1.3 Le chitosane oligomérique

L'hydrolyse du chitosane permet la production de chaînes plus courtes. Ces molécules seront désignées, dans ce mémoire, par les deux termes suivants : 1- Le chitosane oligomérique (ou oligomères de D-glucosamines partiellement acétylées) pour les molécules dont la taille varie généralement entre 1 et 15 unités. 2- L'hydrolysate de chitosane, lorsque la taille des molécules est supérieure à 15 unités. Dans ce cas, le poids moléculaire moyen des chaînes est également spécifié.

Outre l'hydrolyse du chitosane de haut poids moléculaire, de nouvelles méthodes de production du chitosane oligomérique sont à l'étude.

D'abord la synthèse *in vivo*, dans des souches de *Escherichia coli* porteuses des gènes *nodC* ou *nodBC*, codant respectivement pour une chitoooligosaccharide synthétase et une chitoooligosaccharide N-déacétylase. La culture intensive de ces souches recombinantes a permis à Samain et al. (1997) d'obtenir jusqu'à 2.5 g d'oligomères de 5 unités de longueur par litre de culture.

Une méthode de synthèse *in vitro* est aussi en développement. Celle-ci permet d'obtenir des oligomères de 4 à 12 unités de longueur par une voie chimio-enzymatique provoquant la transglycosylation de molécules de chitotrioses N-acétylés (Akiyama et al., 1995). Un désavantage de cette méthode est la non accessibilité du substrat de départ, le chitotriose N-acétylé, qui doit être obtenu par hydrolyse de la chitine ou par synthèse dans *E. coli*.

À l'heure actuelle, ces nouvelles méthodes permettent de produire des quantités restreintes d'oligomères. L'hydrolyse demeure donc une méthode de choix pour le développement d'une méthode de production d'oligomères et d'hydrolysats de chitosane de toutes tailles.

L'hydrolyse du chitosane peut être obtenue par traitement chimique avec des acides forts tels l'acide chlorhydrique ou l'acide fluorhydrique (Horowitz et al., 1957 ; Domard et Cartier, 1989). On peut également traiter le chitosane par voies enzymatiques, soit par des enzymes spécifiques nommées chitosanases (Somashekar et Joseph, 1996), soit par des enzymes qui possèdent une activité non spécifique sur le chitosane. Parmi celles-ci, Terbojevich et al. (1996) rapporte les types d'enzymes suivants: cellulase; hémicellulase; amylase; dextranase; pectinase; lipase et les protéases suivantes : la pepsine, papaïne, bromelaine, ficine et pancréatine.

Le chitosane oligomérique et les hydrolysats de chitosane possèdent, eux aussi, un éventail d'applications potentielles. Il s'agit parfois d'applications comparables à celles du chitosane de haut poids moléculaire tel que l'induction des mécanismes de défense chez les végétaux par exemple. Toutefois, d'autres applications, bien spécifiques aux molécules de petites tailles, sont à l'étude. La petite taille des oligomères rend ces molécules solubles dans l'eau et donc plus accessibles à des pH physiologiques. Ceci permet d'envisager leur utilisation dans des applications médicales, pharmacologiques et diététiques ce qui ouvre la voie au développement de produits biotechnologiques à fortes valeurs ajoutées.

Au cours des années 80, plusieurs recherches ont porté sur l'utilisation des oligomères de glucosamine. Seng (1988), Yamasaki (1992) et Somashekar (1996) rapportent les découvertes des activités antibactérienne, antifongique, antitumorale et immunostimulante de ces composés.

Toutefois, la recherche et le développement d'applications reliées aux oligomères ont beaucoup diminué au cours des années '90. Quelques études ont démontré l'effet phytoprotecteur des oligomères chez les plantes (Li et al., 1995 ; Dutton et al., 1997 ; Akiyama et al., 1995). LeHoux et Grondin (1993) ont également démontré qu'une diète contenant des hydrolysats de chitosane de 70 kDa permet de maintenir une bonne homéostasie du niveau de cholestérol chez les rats, malgré une augmentation de la quantité de cholestérol ingéré.

En somme, il est clair que la non accessibilité de ces composés au niveau commercial diminue considérablement la recherche et le développement de leurs applications. En 1996-7, à notre connaissance, une seule compagnie vend du chitosane oligomérique dont la taille maximale est de 6 unités de longueur, tandis qu'on reconnaît que les oligomères dont la taille varie entre 5 et 15 unités sont les plus susceptibles de posséder une activité physiologique (Muraki, E. et al., 1991). Néanmoins, le coût de ces hexamères de glucosamines représente bien leur rareté puisqu'ils se détaillent à 330\$ US le 100 mg (PDI, BioScience).

1.4 Hydrolyse du chitosane

L'hydrolyse avec des acides forts est peu compatible avec une utilisation des produits dans les domaines pharmaceutique, médical ou diététique. De plus l'hydrolyse totale mène à la production de monomères alors que les produits recherchés doivent avoir au moins 6 unités de longueur. Une hydrolyse partielle doit donc être obtenue. Avec l'acide fluorhydrique (HF), Bosso et al. (1986) ont produit des oligomères de 10 unités et moins en traitant 25g de chitosane dans 100 ml d'acide à 20°C pendant 2 heures. Avec l'acide chlorhydrique, Domard et Cartier (1989) ont obtenu une hydrolyse modérée en traitant 2 g de chitosane dans 100 ml d'acide concentré (~12 M) à 72°C pendant 30 à 180 minutes, produisant ainsi un éventail complet de molécules de tailles différentes. Toutefois, plus l'hydrolyse est poussée, plus la répartition des produits est étendue.

L'hydrolyse chimique nécessite donc l'utilisation de grande quantité d'acide pour traiter de petites quantités de chitosane. De plus, pour envisager une utilisation médicale, diététique ou pharmaceutique des produits, toute trace d'acide doit être éliminée des oligomères (Muraki, R. et al., 1993) ce qui entraîne des coûts de production considérables.

Pour toutes ces raisons, l'hydrolyse enzymatique du chitosane semble être la solution de choix dans le développement d'un procédé de production d'oligomères à moyenne échelle. Tout comme pour l'hydrolyse chimique, le traitement enzymatique extensif du chitosane mène à la production de dimères et trimères de glucosamines avec des traces de monomères. Une hydrolyse partielle doit donc être réalisée. Dans les procédés d'hydrolyse en discontinu ("batch"), l'enzyme doit être inactivée puis éliminée du produit. Ces deux étapes entraînent des coûts de production considérables, surtout si l'enzyme est inactivée après un court temps d'utilisation. Dans ce cas, le coût de production des enzymes est réparti sur une production non optimale d'oligomères.

Pour ces raisons, l'immobilisation des enzymes présente des avantages évidents. D'abord cette méthode permet d'utiliser les enzymes en continu ou en répétition. Également, la purification des produits est facilitée puisque les enzymes demeurent fixées à leur support. Finalement dans plusieurs cas d'immobilisation, la stabilité des enzymes est augmentée par rapport à leur stabilité à l'état libre (Coutouly, 1991).

Jusqu'à maintenant, trois groupes de recherches ont publié des résultats d'étude visant à développer des système d'enzymes immobilisées pour l'hydroyse du chitosane.

Davis et Eveleigh (1984) ont immobilisé une chitosanase de *Bacillus circulans* de quatre façons différentes: 1- par simple adsorption sur du charbon et de la bentonite, 2- par confinement physique ("physical entrapment") à l'intérieur de membranes de collagène, 3- par liaisons covalentes sur une membrane de collagène-glutaraldéhyde et 4- par liaisons covalentes sur des billes d'agarose activées au carbodiimidazole. Avec les 2 premières méthodes, une désorption rapide des enzymes a été observée et donc peu d'activité était conservée à travers le temps d'utilisation. Par liaisons covalentes, l'activité après immobilisation correspond à 5-10% de l'activité initiale des enzymes. Cette diminution s'explique par le fait que la liaison covalente implique la participation des groupements aminés des a.a. de l'enzyme (Coutouly et al., 1991) ce qui affecte l'activité enzymatique. Toutefois la stabilité des enzymes immobilisées de cette façon est très grande. Lors d'une expérience avec les enzymes immobilisées sur des billes d'agarose activées au carbodiimidazole, après 21 jours d'utilisation à l'intérieur d'un réacteur de type colonne à 37°C, à peine 20% de l'activité initiale a été perdue. Parmi les désavantages de l'immobilisation par liaisons covalentes, notons que les agents chimiques impliqués sont généralement très toxiques et doivent être complètement éliminés du support avant son usage à des fins commerciales. Également, l'immobilisation requiert plusieurs étapes et l'utilisation de réactifs chimiques dénaturants. Finalement, le rendement de l'immobilisation dépend de la pureté de l'enzyme (Coutouly, 1991).

Yamasaki et al. (1992) ont évalué la possibilité d'immobiliser une enzyme chitosanolytique de *Enterobacter* sp. G-1 de quatre différentes façons: 1- par immobilisation ionique sur une résine échangeuse d'anions fortement basique, 2- par immobilisation covalente sur une résine échangeuse d'ions faiblement basique traitée à la glutaraldéhyde, 3- par adsorption sur du chitopearl (bille contenant du chitosane hydrophobique qui lie les ions) et 4- par confinement sur alginate de calcium ("gel entrapment"). Leurs résultats démontrent que les immobilisations ionique et par adsorption permettent un relâchement important des enzymes. L'immobilisation sur alginate de calcium n'a pas permis d'obtenir une bonne hydrolyse du chitosane. Pour expliquer ce résultat, les auteurs proposent que le substrat ne pouvait passer à travers le gel. Finalement l'immobilisation covalente à la glutaraldéhyde diminue encore de façon considérable l'activité initiale des enzymes.

Le dernier travail est celui de Terbojevich et al. (1996). Ce groupe a immobilisé une papaine de *Carica papaya* sur de la poudre de chitine par liaisons covalentes. Encore une fois, l'enzyme est couplée par voie chimique à l'aide de la glutaraldéhyde ce qui lui fait perdre une partie de son activité. L'enzyme doit être purifiée avant immobilisation. De plus elle clive le chitosane de façon non spécifique. Elle est donc moins efficace que les chitosanases dans cette hydrolyse et demande un long temps de réaction pour obtenir des hydrolysats de courtes tailles.

Suite à ces travaux, il apparaît clairement qu'une méthode d'immobilisation simple et efficace serait d'une grande utilité dans le développement d'une méthode de production d'oligomères et d'hydrolysats de chitosane à moyenne échelle. Il s'agit du premier objectif des travaux effectués dans le cadre de cette maîtrise. Pour l'atteindre, nous avons imaginé et réalisé des constructions génétiques permettant de produire des chitosanases pluri-modulaires portant des domaines d'attachement à la cellulose.

1.5 Les domaines d'attachement à la cellulose

Les domaines d'attachement à la cellulose (CBD) sont des modules protéiques qui permettent l'attachement des protéines à la cellulose. D'abord identifiés chez les cellulases, la présence de CBDs a ensuite été démontrée dans d'autres types d'enzymes hémicellulosiques tels des xylanases, glucanases, acétyl estérase, etc. (Millward-Sadler et al., 1994). On sait aujourd'hui que des domaines d'attachement sont également retrouvés dans des protéines dépourvues d'activité enzymatique tel que les sous-unités d'assemblage ("scaffolding subunits") des cellulosomes (Lamed et al., 1994). On retrouve également des CBDs chez des chitinases mais aucune chitosanase possédant un tel domaine d'attachement n'a été identifiée à ce jour.

La dénomination "CBD" tient tant pour les domaine d'attachement à la cellulose, que des domaines d'attachement au xylane et à la chitine. En fait, non seulement le "C" convient bien aux termes cellulose, chitine et "carbohydrate", mais de plus la spécificité des domaines d'attachement étudiés à ce jour est très variable. Ainsi, il arrive régulièrement que le CBD d'une cellulase reconnaisse le xylane et/ou la chitine. L'inverse est vrai pour un CBD de chitinase ou de xylanase. Ceci n'a rien de surprenant si on considère que tous les CBDs reconnaissent des polysaccharides qui, jusqu'à un certain point, possèdent des compositions chimiques et des structures comparables. Des considérations évolutives peuvent même expliquer qu'une xylanase possède un CBD liant la cellulose fortement puisque la structure de la cellulose varie beaucoup moins que celle du xylane et que les deux composés sont retrouvés en étroite association dans la nature (Black et al., 1995).

La liaison des CBDs à leur substrat serait permise par trois type d'interactions: 1- Des liens hydrogènes classiques entre les atomes polaires. 2- Des interactions directes entre les sucres et les acides aminés aromatiques (tryptophanes et tyrosines), toujours présents dans les CBDs. À ce niveau la polarisation des électrons π dans les cycles aromatiques apporterait un gain d'énergie considérable à la liaison. 3- Augmentation de la stabilité par la mise en contact de deux surfaces qui, dans l'ensemble, sont hydrophobes (Hoffrén et al., 1995).

Les CBDs connus à ce jour varient dans leurs séquences d'acides aminés et dans leurs structures. Dans l'organisation modulaire typique des protéines naturelles, les domaines d'attachement sont séparés des modules catalytiques par des séquences espaceurs ("linker"). Les CBDs se retrouvent en positions C- et N-terminale des protéines et aussi en position interne dans certains peptides complexes formés de trois modules ou plus. La structure et la fonction des CBDs sont rarement reliées à la présence des modules adjacents. Ainsi différents remplacements de ces modules ont été effectués dans le but de créer divers peptides d'intérêts.

Par génie génétique, Ong et al. (1995) ont construit la séquence génétique codant pour un peptide possédant les quatre modules suivant: [CBD] - [espaceur] - [acides aminés IEGR] - [interleukine-2]. La séquence d'acides aminés "IEGR" permet la protéolyse par le facteur Xa. Ce gène, exprimé efficacement dans les cellules eukariotes Cos, permet de purifier le peptide par simple contact avec la cellulose. Par la suite l'interleukin-2 est isolée par protéolyse à l'aide du facteur Xa (Ong et al., 1995).

Kyaw et al. (1994) ont fusionné les séquences codant pour un CBD et un domaine d'attachement au anticorps IgGs. Le peptide qui résulte de l'expression de ce gène permet de produire une matrice de purification des IgGs à faible coût.

Ong et al. (1991) ont également présenté l'utilisation d'un CBD pour immobiliser une glucosidase sur de la cellulose. Dans cet exemple, l'enzyme demeure active, stable et est fortement liée au support.

Des dizaines d'exemples d'utilisation des CBDs sont présentés dans la littérature. Un des avantages de ces domaines d'attachement est qu'ils permettent une liaison très forte à un support peu dispendieux et disponible en grande quantité, en l'occurrence la cellulose.

Tous ces exemples de même que la disponibilité, dans notre laboratoire, du gène *csn* codant pour la chitosanase de *Streptomyces* sp. N174 nous ont amené à planifier la construction de gènes de fusion codant pour des chitosanases munies d'un site d'attachement.

1.6 Construction de gènes modulaires codant pour des chitosanases munies d'un domaine d'attachement

Lors de ces constructions génétiques, deux domaines d'attachement ont été utilisés: le CBD de l'exoglucanase Cex de *Cellulomonas fimi* (nommé CBD_{Cex} dans la suite du texte) et le CBD de la xylanase XlnB de *Streptomyces lividans* (nommé XBD dans la suite du texte).

La plus récente classification des domaines d'attachement à la cellulose est celle proposée par Tomme et al. (1995). Elle classe plus de 120 domaines d'attachement sur la base de leurs homologies de séquences et également sur la base des propriétés fonctionnelles connues. Dans cette classification qui compte 10 familles, numérotées en chiffre romain de I à X, les deux CBDs utilisés sont de la famille II. Cette famille se subdivise en deux sous familles, a et b. Le CBD_{Cex} fait partie de la famille IIa tandis que le XBD fait partie de la famille IIb. Les domaines d'attachement de la famille II sont longs d'une centaine d'acides aminés et contiennent quatre résidus tryptophanes hautement conservés. Dans la sous-famille IIb, les 8 acides aminés de l'extrémité C-terminale (incluant un résidu tryptophane) sont absents. Les domaines de la famille IIb se retrouvent de façon prédominante chez les xylanases et s'attachent tant au xylane qu'à la cellulose. Les domaines de la famille IIa se retrouvent, quant à eux, dans divers types d'enzymes mais ne s'attachent qu'à la cellulose (Tomme et al., 1995).

Le gène *csn* de *Streptomyces* sp. N174 est le module génétique qui a été utilisé comme séquence codante pour le domaine catalytique des enzymes de fusion. Ce module génétique fournit également les régions promotrices, nécessaires à la transcription des gènes, et la partie 5' de l'ARN messager comprenant, entre autre, le domaine d'attachement aux ribosomes. Également les 120 premiers nucléotides de la séquence codante du module *csn* codent pour un

peptide signal qui permet la sécrétion des enzymes et est clivé durant celle-ci (Masson et al., 1994).

Finalement, lors de la création des gènes de fusion permettant de produire des chitosanases immobilisables, cinq possibilités d'espacements des modules ont été utilisées. Les domaines *cbd_{Cex}* et *csn* ont été fusionnés: 1- sans espaceur, 2- avec un espaceur riche en acides aminés prolines et thréonines (PT), 3- avec un espaceur riche en acides aminés glycines (G), 4- avec un espaceur riche en acides aminés acides, donc chargé négativement (NEG) et 5- avec un espaceur riche en acides aminés basiques, donc chargé positivement (POS). Dans le cas du module *xbd*, seule la fusion avec l'espaceur riche en glycines a été réalisée.

Le choix des espaceurs a été fait de façon à imiter les possibilités retrouvés dans les enzymes modulaires naturelles.

Le module codant pour l'espaceur riche en proline et thréonine a été obtenu à partir de la séquence codant pour la cellulase Cex de type sauvage de *C. fimi*. Il s'agit donc d'une séquence "naturelle". De la même façon, le module codant pour l'espaceur riche en glycine a été obtenu du gène de la xylanase XlnB de type sauvage de *S. lividans* (Shareck et al., 1995). Les deux modules codants pour les espaceurs chargés POS et NEG ont été créés par synthèse d'ADN, mais imitent des séquences retrouvées naturellement et décrites par Gilkes et al. (1991).

La nature de l'espaceur peut influencer plusieurs paramètres, c'est pourquoi nous avons décidé d'évaluer ces cinq possibilités. D'abord la fonction des espaceurs serait de permettre une action indépendante des domaines qu'ils relient (Gilkes et al., 1991). La nature de l'espaceur peut également influencer la stabilité de l'enzyme lors de sa production. Principalement chez *Streptomyces*, on connaît bien l'action des protéases naturelles du microorganisme, lesquelles s'attaquent aux protéines produites par les souches recombinantes. Les espaceurs peuvent également influencer la stabilité des enzymes une fois immobilisées. Finalement l'intérêt des espaceurs chargés est de vérifier si la charge de ces derniers peut influencer la spécificité de

l'enzyme vis à vis du substrat et surtout de la taille de ce dernier. En solution, le chitosane est chargé positivement et nous voulons vérifier si la présence d'une charge au niveau de l'espaceur peut influencer l'activité de l'enzyme par un jeu de répulsion des petites molécules de substrat ou d'attraction des plus grosses molécules. Une telle observation serait très utile dans la production de chitosane oligomérique de taille intermédiaire (9 à 15 unités).

Tous ces points n'ont pas été vérifiés au cours des travaux présentés dans ce mémoire mais pourront l'être sous peu puisque toutes les constructions génétiques ont été réalisées et chacun des gènes modulaires a pu être exprimé dans *Sreptomycetes lividans* TK24.

1.7 Système modulaire

Toutes les fusions génétiques ont été faites de façon à conserver, dans la mesure du possible, un site de restriction *BcII* unique dans les différents gènes modulaires, situé à l'extrémité 3' du domaine *csn*. Et de la même façon, un site de restriction *NheI* unique dans les gènes modulaires, à l'extrémité 5' des domaines d'attachement. Le patron des constructions ainsi obtenu est présenté à la figure 1.3. L'objectif de ce système modulaire est de permettre un transfert facile des différents modules lors de futures constructions, lesquelles pourraient être envisagées à la lumière des résultats obtenus à l'aide de cette première série de protéines modulaires.

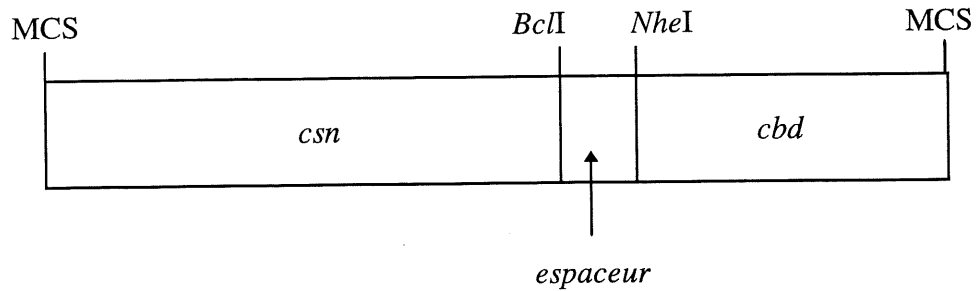


Figure 1.3: Organisation modulaire des gènes de fusion. Les sites de restriction *BclII* et *NheI* sont uniques dans tous les gènes de fusion. Les portions du site de clonage multiple (MCS) qui bordent les gènes de fusion de chaque côté fournissent plusieurs autres sites de restriction uniques permettant l'excision des modules.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Manipulations génétiques

2.1.1 Souches bactériennes

Les différentes souches d'*Escherichia coli* utilisées lors des manipulations génétiques sont présentées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1: Sommaire des souches d'*Escherichia coli* utilisées.

Souches	Caractéristiques particulières	Utilisations
<ul style="list-style-type: none"> JM109 (Yanish-Perron et al, 1985) 	<ul style="list-style-type: none"> Possède l'épisome F' <i>thi</i>- 	<ul style="list-style-type: none"> Production d'ADN plasmidique double brins des plasmides pALTER et pUC19 Transformation des produits de ligation
<ul style="list-style-type: none"> DH5αF' (Raleigh et al., 1989) 	<ul style="list-style-type: none"> Possède l'épisome F' <i>thi</i>- 	<ul style="list-style-type: none"> Production d'ADN plasmidique double brins des plasmides pUC19 et pFD666 Production d'ADN plasmidique simple brin
<ul style="list-style-type: none"> GM272 (<i>E. coli</i> Genetic Stock Center, Yale University) 	<ul style="list-style-type: none"> <i>dam</i>- et <i>dcm</i>- 	<ul style="list-style-type: none"> Production d'ADN plasmidique double brins non méthylé par les méthylases DAM et DCM
<ul style="list-style-type: none"> BMH 71-18mut S (Promega, Madison, Wisconsin) 	<ul style="list-style-type: none"> Ne répare pas les bases non appariées Résistante à la tétracycline 	<ul style="list-style-type: none"> Première transformation et amplification des produits de mutagenèse dirigée

2.1.2 Plasmides et oligonucléotides

Les vecteurs plasmidiques pALTER et pUC19 ont été utilisés pour la construction des gènes de fusion. Lorsque complétés, ces gènes ont été transférés dans le vecteur navette pFD666 (Denis et Brzezinski, 1992) pour permettre leur expression dans *S. lividans* TK24. Les cartes physiques de ces trois plasmides sont présentées, respectivement, par les figures 2.1, 2.1 et 2.3.

Cinq des sept modules génétiques utilisés pour les constructions ont été obtenus à partir des plasmides présentés par le tableau 2.2. Les deux autres modules utilisés ont été obtenus par appariement d'oligonucléotides complémentaires (voir tableau 2.3).

Les oligonucléotides utilisés lors des manipulations génétiques sont présentés aux tableaux 2.3 et 2.4.

Tableau 2.2: Origine plasmidique des modules génétiques utilisés.

Plasmide	Module fourni	Référence	Figure
pALTER- <i>csnB</i>	<i>csnB</i> _{Cex}	Sané, 1995	2.4
pALTER390	<i>csn-cbd</i> _{Cex}	Sané, 1995	2.5
pTZ18R:XlnB	<i>xbd</i> et <i>g</i>	Shareck et al., 1995	2.6
pIJ680-PT-CBD _{Cex}	<i>pt-cbd</i> _{Cex}	Ong et al., 1994	2.7

Tableau 2.3: Séquence des oligonucléotides.

Oligonucléotide	Séquence
P	5'AGAGGATCCCT <u>G</u> ATCACGTAC ^{3'}
Q	5'GCACCCGCCGCT <u>A</u> GCGCCCCCGTTG ^{3'}
EcoRV	5'TTGGGGATATT <u>G</u> TCCATTCCGA ^{3'}
Amp	Produit commercial (séquence non disponible)
Neg.Link.1	5'CTAGTGATCCAGACACCCCTGAGCCCGAAACGCCGGAACCAGCTGAGG ^{3'}
Neg.Link.2	3'ACTAGGTCTGTGGGGACTCGGGCTTTGCGGCCTTGGTCGACTCCGATC ^{5'}
Pos.Link.1	5'GATCAGCCACCCGTCGAGGCACACGCCGAAGTCGCCCCACCCGACGCACG ^{3'}
Pos.Link.2	3'TCGGTGGGCAGCTCCGTGTGCGGCTTCAGCGGGGTGGGCTGCGTGCGATC ^{5'}

Les caractères soulignés indiquent les nucléotides permettant d'introduire une mutation, lorsque cela s'applique. Les séquences des oligonucléotides Neg.Link.2 et Pos.Link.2 sont présentées dans l'orientation 3'→5' pour démontrer leur complémentarité avec les oligonucléotides Neg.Link.1 et Pos.Link.1, respectivement.

Tableau 2.4 : Résumé de l'utilisation des oligonucléotides.

Oligonucléotide	Utilité	Source
P	Oligonucléotide mutagène permettant d'introduire un site <i>BclII</i> à la jonction des modules <i>csn</i> et <i>cbd_{Cex}</i> , dans pATS390	Synthèse au laboratoire, sur Gene Assembler, de Beckman
Q	Oligonucléotide mutagène permettant d'introduire un site <i>NheI</i> à la jonction des modules <i>csn</i> et <i>g-xbd</i> , dans pBP151	
<i>EcoRV</i>	Oligonucléotide mutagène permettant d'éliminer un site de restriction <i>EcoRV</i> non essentiel dans pALTER	
Amp ^r	Oligonucléotide complémentaire sur toute sa séquence (donc non mutagène) pour pATS390 et pBP151, utilisé lors des réactions de mutagenèse pour faciliter la synthèse du brin d'ADN mutant	Altered Sites TM System, Promega
Neg.Link.1 et Neg.Link.2	Paire d'oligonucléotides complémentaires entre eux qui, une fois appariés, fournissent le module génétique (-), qui code pour un espaceur chargé négativement	ProtoGene Laboratories, pour GibcoBRL/Life Technologies
Pos.Link.1 et Pos.Link.2	Paire d'oligonucléotides complémentaires entre eux qui, une fois appariés, fournissent le module génétique (+), qui code pour un espaceur chargé positivement	

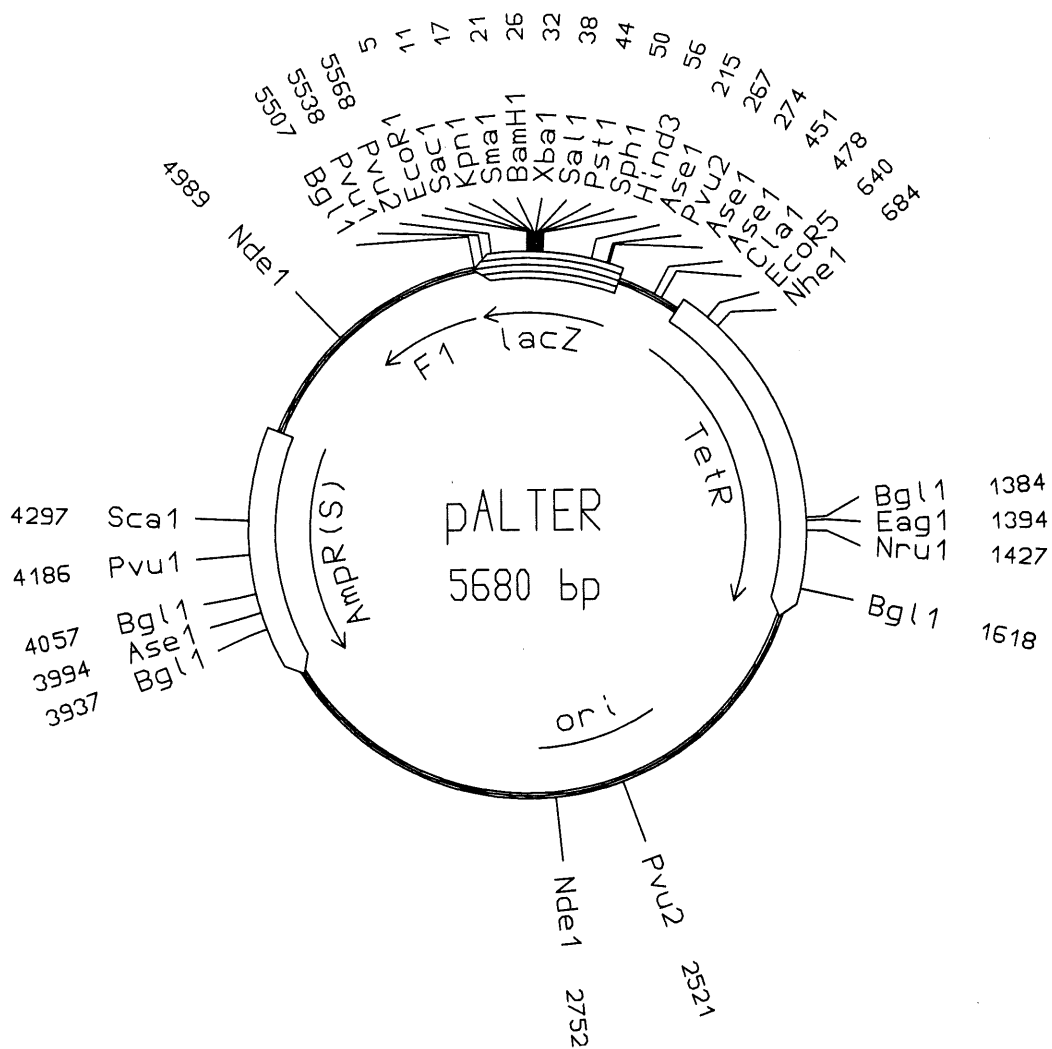


Figure 2.1: Carte physique du plasmide pALTER. Seuls les principaux sites de restriction sont indiqués. Amp (S) : gène de résistance à l'ampicilline inactivé par mutation; TetR : gène de résistance à la tétracycline; f1 : origine de réplication du bactériophage f1; lacZ : séquence du module lacZ (codant pour la portion N-terminale de la β-galactosidase d'*E. coli*); ori: origine de réplication reconnue par *E. coli*.

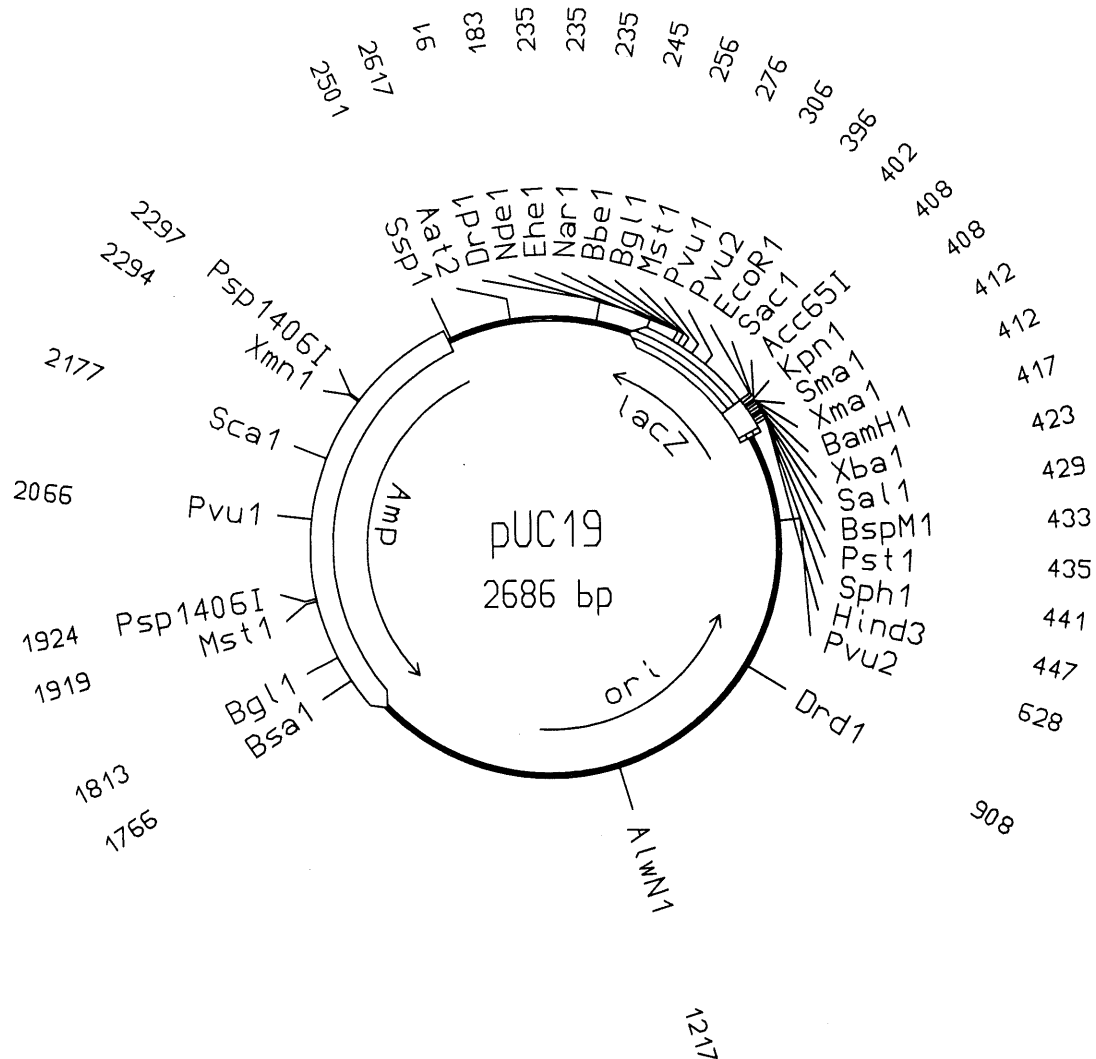


Figure 2.2: Carte physique du plasmide pUC19. Seuls les sites de restriction présents à deux positions ou moins sont indiqués. Amp: gène de résistance à l'ampicilline; lacZ : séquence du module lacZ (codant pour la portion N-terminale de la β -galactosidase d'*E. coli*); ori: origine de réplication reconnue par *E. coli*.

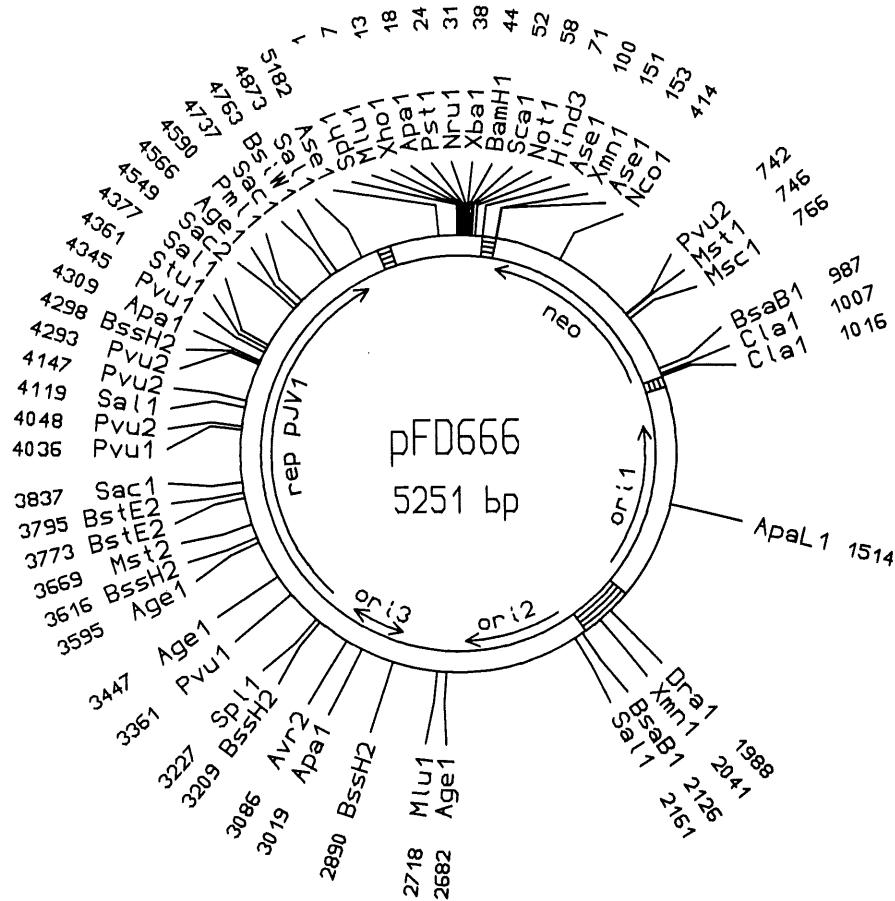


Figure 2.3: Carte physique du vecteur navette pFD666. Seuls les principaux sites de restriction sont représentés. Ori1 = origine de réplication d'*E. coli* ; ori2 = origine de réplication du phage M13 ; ori3 = origine de réplication du plasmide pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes*; repJV1 : gène codant pour la protéine REP; neo : gène de résistance à la kanamycine (Denis et Brzezinski, 1992).

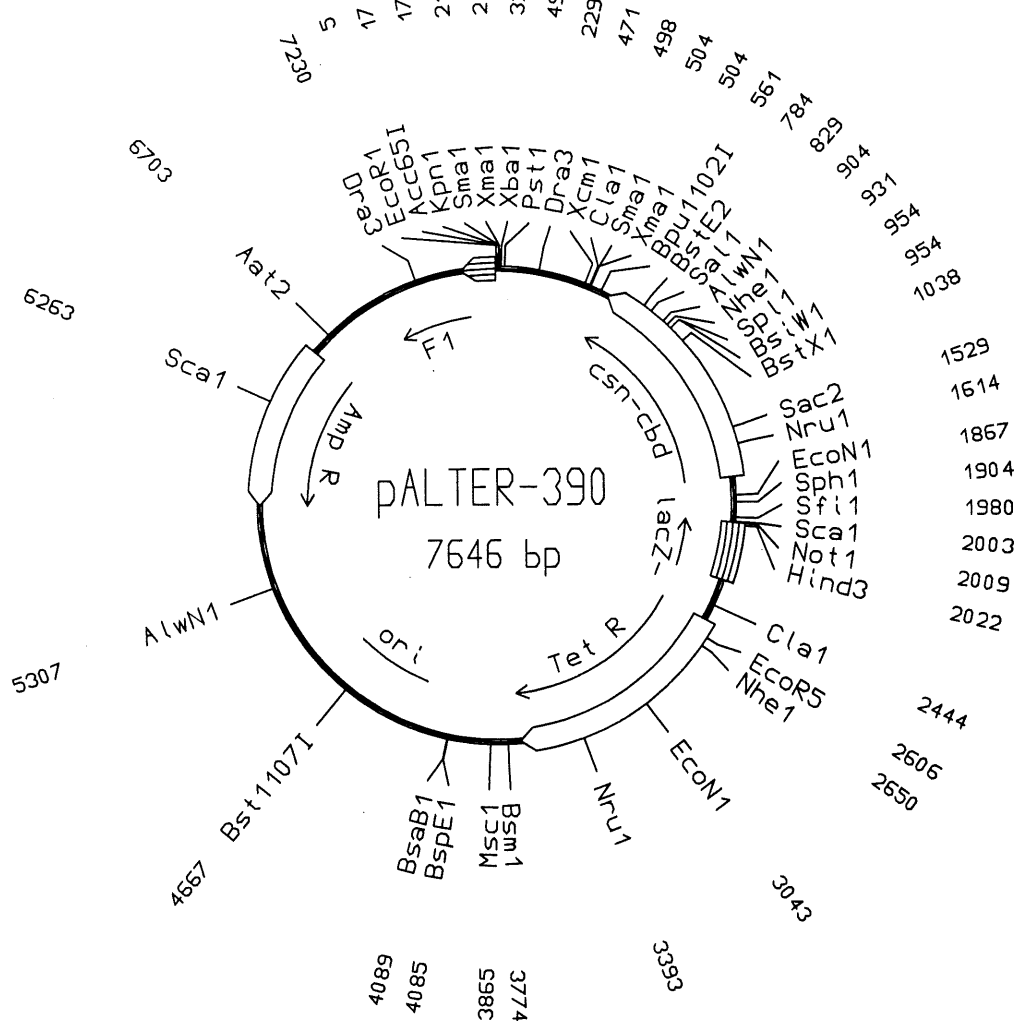


Figure 2.5: Carte physique du plasmide pALTER390. Seuls les principaux sites de restriction sont indiqués. csn-cbd : gène de fusion *csn-cbd*_{Cex}; Amp^R : gène de résistance à l'ampicilline; Tet^R : gène de résistance à la tétracycline; ori_{f1} : origine de répllication du bactériophage f1; lacZ⁻ : séquence interrompue du module lacZ; ori : origine de répllication reconnue par *E.coli*.

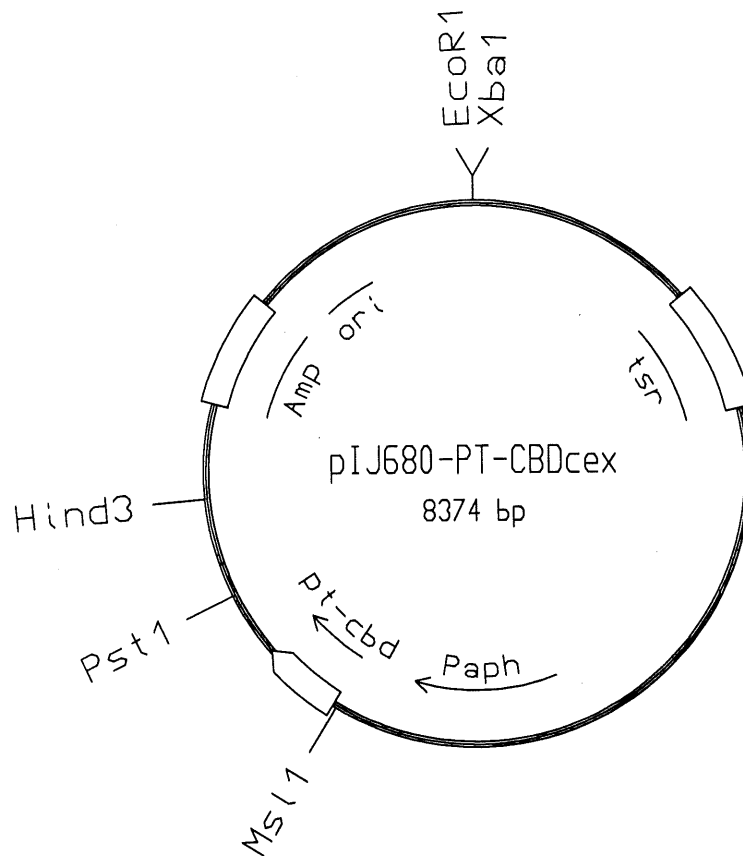


Figure 2.7: Carte physique du plasmide pIJ680-PT-CBD_{cex}. Adaptation d'une figure de Ong et al., (1994), les séquences d'acides nucléiques n'étant pas disponibles. Amp : gène de résistance à l'ampicilline; Paph : séquence promotrice du gène *aph*; *tsr* : gène de résistance au thiostrepton; *ori* : origine de répllication de *E. coli*; *pt-cbd*: séquence codant pour le domaine d'attachement à la cellulose et l'espaceur riche en prolines et thréonines de *C. fimi*.

2.1.3 Milieux de culture

Les souches d'*E. coli* ont été cultivées en milieu liquide LB et sur milieu solide LB-agar 1.5% (Sambrook *et al.*, 1989). Les souches recombinantes ont été cultivées dans ces mêmes milieux auxquels était ajoutés les antibiotiques appropriés dans les concentrations suivantes : ampicilline : 125 µg/ml, kanamycine : 50 µg/ml, tétracycline : 15 µg/ml.

Avant de traiter la souche DH5αF' pour en faire des cellules compétentes, celle-ci a été cultivée sur milieu minimum solide M9, contenant 1mM de thiamine, 0.04% de glucose et 1.5% d'agar (Sambrook *et al.*, 1989).

Toutes les cultures d'*E. coli* ont été faites à 37 °C.

2.1.4 Préparation et transformation de *E. coli* compétentes

La préparation et la transformation d'ADN plasmidiques dans *E.coli* ont été réalisées en suivant le protocole no.1 proposé par Sambrook et al. (1989).

2.1.5 Extraction d'ADN plasmidique de *E. coli*

Les différents ADNs plasmidiques utilisés dans ces travaux ont été extraits des souches de *E.coli* recombinantes par la méthode de lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989). Un protocole de mini-préparation rapide (Le Gouil et al., 1994) a aussi été suivi pour analyser rapidement les ADNs plasmidiques des nombreux candidats aux constructions génétiques.

2.1.6 Traitements enzymatiques des ADNs

Les digestions et ligations des ADNs ont été réalisées en suivant les recommandations des fournisseurs (Pharmacia, Boehringer Mannheim et New England Biolabs).

Le remplissage d'extrémité cohésives, à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I (Klenow) s'est effectué en présence de tampon OFA⁺ 1X (Pharmacia/Biotech), de 5 mM de chacun des dNTPs appropriés et de 0.075 % de BSA, avec les concentrations d'ADN et d'enzyme recommandées par le fournisseur, le tout durant 30 min. à 37°C.

Le traitement à la nucléase Mung Bean s'est fait en présence de tampon OFA⁺ 1X (Pharmacia/Biotech) et de 1 mM de ZnSO₄, avec les concentrations d'ADN et d'enzyme recommandées par le fournisseur, le tout durant 30 min. à 30°C.

2.1.7 Appariement des oligonucléotides complémentaires

L'appariement des oligonucléotides complémentaires (Neg.Link. 1 et 2; Pos.Link. 1 et 2) s'est fait en plongeant 100 µl de solution contenant ~ 500 pMol. de chacun des oligonucléotides dans un bain d'huile minérale (~ 100 ml) préalablement chauffé à une température de 110 °C. Le chauffage a alors été arrêté et la solution d'oligonucléotides a été incubée dans ce bain d'huile jusqu'à ce que la température de ce dernier ait atteint ~ 20 °C. L'appariement des oligonucléotides a été vérifié par migration sur gel de polyacrylamide 12% en utilisant le TBE comme tampon de migration.

2.1.8 Mutagénèse in vitro dirigée par oligonucléotides

Les mutagénèses in vitro dirigées par oligonucléotides ont été effectuées en suivant une adaptation du protocole proposé par Deng et Nickoloff (1992). Les adaptations sont les suivantes: 1- Optimisation du temps et de la température de dénaturation de l'ADN plasmidique db (7 min. à 105°C pour pALTER390 et pBP151). 2- Utilisation d'un troisième oligonucléotide, complémentaire sur toute sa séquence, pour favoriser l'élongation par la polymérase en offrant un troisième site potentiel d'initiation. Les 2 premiers sites potentiels d'initiation étant fournis par l'oligonucléotide mutagène et l'oligonucléotide *EcoRV* (voir section 2.2)

2.1.9 Analyse sur gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN générés par digestions enzymatiques, a été effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les concentrations d'agarose utilisées varient de 0,5 à 2%, selon la taille des fragments à séparer. De plus le tampon d'électrophorèse utilisé est le TBE pour les séparations visant à analyser les patrons de migration et le TAE pour les séparations visant à purifier des fragments par la méthode GENE CLEAN.

Suite à leur migration par électrophorèse sur gel d'agarose, des fragments d'ADN spécifiques ont pu être extraits et purifiés du gel par la méthode "GENE CLEAN" décrite par Bio 101 Inc.

Finalement, l'appariement des oligonucléotides a été vérifié par migration sur gel de polyacrylamide 12% utilisant le TBE comme tampon de migration et le bromure d'éthidium comme colorant.

L'échelle de poids moléculaires "Kb DNA Ladder" de Gibco BRL a été utilisée pour indiquer la taille des fragments séparés par électrophorèse. Les poids moléculaires représentés par cette

échelle sont les suivants (en paire de bases et en ordre décroissant): 12 216, 11 198, 10 180, 9 162, 8 144, 7 126, 6 108, 5 090, 4 072, 3 054, 2 036, 1 636, 1 018, 517, 506.

2.1.10 Séquençage

Le séquençage d'ADN a été réalisé par la méthode de Sanger *et al.* (1977) en utilisant les mélanges réactionnels "Deaza G/A ^{T7}Sequencing™ Mixes" de Pharmacia/Biotech et l'enzyme commerciale T₇ Sequanase de USB (United States Biochemical Corporation). Le protocole fourni par Pharmacia/Biotech a été suivi avec les modifications suivantes: 1- À l'étape d'appariement, ajout de 1,4 µl de DMSO au 14 µl de solution (rapport v/v ~ 10%); 2- Élongation en présence de chlorure de manganèse 0,005 M et de sodium isocitrate 0,0075 M. 3- Ajout de 0,4 µl DMSO lors des réactions de terminaison, pour conserver un rapport v/v ~ 10 %. Ces modifications permettent de minimiser l'effet des compressions (DMSO) et de séquencer plus efficacement la région adjacente à l'amorce (chlorure de manganèse). Le mélange A mix a été utilisé et suppléé de 1µl de α³⁵S-dATP 10 mCi/ml, 1000 Ci/mMol.

Deux méthodes ont été utilisées pour obtenir l'ADN sb nécessaire au séquençage: 1- Traitement alcalin de l'ADN db, tel que décrit par Pharmacia/Biotech; 2- Co-infection des souches d'*E. coli* recombinantes par le phage M13KO7 et extraction d'ADN plasmidique sb, tel que décrit par Promega.

Les réactions de séquençage ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8%, en utilisant le tampon TBE, sous un voltage constant de 2500 Volts, dans un appareil MacroPhor (Pharmacia/Biotech).

Les gels de séquence ainsi obtenus ont été séchés puis exposés à des films Kodak X-OMAT AR.

2.2 Production des enzymes de fusion

2.2.1 Souches bactériennes

L'actinomycète *Streptomyces lividans* TK24 a été utilisé pour la transformation et l'expression des gènes de fusion. Le clone *S. lividans* TK24 (pATS390) obtenu par Sané (1995) a également été utilisé pour la production de la protéine de fusion CSN-CBD_{Cex}. La souche *S. lividans* TK24 (pRL270), obtenue par Masson et al. (1993), a été utilisée comme témoin positif lors des tests d'activité chitosanolytique sur milieux solides chitosane-agar.

2.2.2 Milieux de culture

Les souches de *Streptomyces lividans* TK24 (sauvage et recombinantes) ont été cultivées dans différents milieux, selon l'usage.

Les souches ont été maintenues sous leur forme sporulée sur milieu solide SLM3 (Dewitt, 1985). Les contrôles de contamination ont été faits sur milieux solides YME (par litre: 4 g de glucose; 4 g d'extrait de levure; 10 g d'extrait de malt; et 15 g d'agar).

Le milieu liquide YEME a été utilisé pour la préparation de protoplastes de *S. lividans* TK24, (Hopwood *et al.*, 1985).

La transformation de *S. lividans* TK24 à été réalisée en suivant le protocole décrit par Hopwood et al., (1985). La régénération des protoplastes a été réalisée sur milieux solides R5, recouverts de "Soft Nutriment Agar" contenant 5mg de kanamycine (Note: toutes les transformations ont été faites avec des ADNs plasmidiques dérivés du plasmide pFD666, porteur d'un gène de résistance à la kanamycine).

La détection préliminaire de l'activité chitosanolitique des souches *S. lividans* TK24 recombinantes a été effectuée sur milieu solide "agar-chitosane" pour *S. lividans*. Ce milieu se prépare en deux étapes: 1- Préparer une solution de base : 170 ml H₂O contenant 3.6 g d'agar et 0.1 g peptone; stérilisée à l'autoclave. 2- À cette solution, ajouter dans l'ordre et avec agitation constante: 90 ml de solution de chitosane 1.0% dissous dans du HCl 0.1 M; 30 ml de solution de sels 10x (par litre: 10.0 g de MgSO₄·7H₂O; 10.0 g de NaCl; 1.0 g de K₂HPO₄; 0.1 g de FeSO₄·7H₂O; 0.1 g de CaCl₂·2H₂O; 0.007g de ZnCl₂ et 0.065g de MnCl₂·4H₂O); 10 ml de tampon phosphate (K₂HPO₄ 0.25 M, p.H. non ajusté); et 1 ml de KOH 5 M.

Les précultures des souches recombinantes ont été faites en milieu liquide Tryptic Soy Broth (Difco) contenant 50 µg/ml de kanamycine et 50 µg/ml de streptomycine.

Après 48h à 72h d'incubation les précultures ont été utilisées pour l'ensemencement de milieux de production de chitosanase (milieu chitosane liquide, par litre : 15 g de chitosane; 5 g d'extrait de malt; 1 g de NH₄SO₄, 0.5 g de K₂HPO₄; 0.2 g de MgSO₄·7H₂O; 0.01 g de CaCl₂·2H₂O; 0.01 g de FeSO₄·7H₂O; 2 ml d'huile d'olive; 1 ml de solution d'éléments traces (Hopwood *et al.*, 1985); 100 ml de tampon MOPS 1M, p.H. 7.0 et 1 ml d'une solution de riboflavine 1g/l. L'ensemencement de ces milieux a été fait à 1% (V/V), c'est à dire 1 ml de culot de préculture (centrifugée 15 min. à 2500 g) par 100 ml de milieu chitosane liquide.

Toutes les cultures de *S. lividans* ont été faites à 30°C. Pour permettre une bonne aération, les cultures liquides ont été maintenues dans des erlenmeyers dont les volumes étaient au moins 4 fois supérieurs aux volumes du liquide cultivés. Les cultures liquides ont également été agitées à 300 rpm.

2.2.3 Préparation et transformation de protoplastes de *S. lividans* TK24

Pour permettre l'expression des gènes de fusion dans *S. lividans* TK24, des protoplastes de ce microorganisme ont été préparés et transformés en suivant le protocole rapide ("rapid small scale procedure") décrit par Hopwood et al. (1985). La sélection des transformants a été faite en recouvrant chaque pétri de transformation de 4 ml. de "soft nutriment agar" contenant 5 mg de kanamycine. Les plasmides issus de l'insertion des gènes de fusion dans le vecteur navette pFD666 ont tous été transformés de cette façon dans *S. lividans* TK24. Une colonie résistante à l'antibiotique a été isolée pour chacun des plasmides et conservée en culture pure.

2.2.4 Production et purification des protéines de fusion

Une fois transformés dans *S. lividans*, les gènes de fusion ont été exprimés de façon à produire les différentes enzymes de fusion. La procédure suivante a été suivie pour chacune des enzymes : La souche recombinante a d'abord été cultivée dans 50 ml de milieu TSB (Difco) contenant 50 µg / ml de kanamycine, de 24 à 48 h. Cette pré-culture a ensuite été centrifugée 10 min. à 800×g et le culot de bactéries a été ressuspendu dans deux volumes de NaCl 0.9%. Ensuite, 15 ml de cette suspension ont été utilisés pour inoculer 500 ml de milieu de production de chitosanase (décrit à la section 2.3). La culture a ensuite été incubée à 30°C avec agitation (300 rpm).

La récolte d'enzymes s'est effectuée en centrifugeant les cultures 15 min à 800×g et en filtrant le surnageant obtenu à travers un filtre « PreSep Prefilter » de 1 Micron, (Micron Separation Inc.). Les enzymes de fusion, contenues dans ces surnageants, ont ensuite été immobilisées.

2.2.5 Dosage des protéines

Les concentrations de protéines totales ont été évaluées par la méthode de Bradford en utilisant le réactif commercial « Bio-Rad Protein Assay » de la compagnie Bio-Rad. Les résultats ont été interprétés à l'aide d'une courbe standard de Albumine de Sérum Bovin (BSA), linéaire entre 2 et 20 µg/ml. De l'eau distillée a été utilisée pour déterminer le zéro.

2.2.6 Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide-SDS

Le protocole proposé par Sambrook et al. (1989) a été suivi. Les analyses ont été faites sur des « mini-gels » de 0.75mm d'épaisseur et contenant 10% d'acrylamide. La quantité de protéines totales appliquée par puits varie de 3 à 7 µg. Les échantillons de départ qui étaient trop dilués ont été concentrés par ultrafiltration à l'aide d'unités filtrantes « Ultrafree-MC (Low binding regenerated cellulose) » de la compagnie Millipore. Deux types d'expériences ont été réalisés pour vérifier l'adsorption des protéines aux membranes de cellulose modifiée. Des échantillons de surnageants de culture ont été concentrés puis redilués avec le liquide ayant traversé la membrane d'ultrafiltration. Ces échantillons traités ont ensuite été comparés à leurs témoins non traités pour : 1- la quantité de protéines totales et 2- l'intensité des bandes suite à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS. Nos résultats indiquent que peu (<5%) ou pas de protéines s'adsorbent à la cellulose modifiée composant les unités filtrantes Ultrafree-MC. Les gels ont été colorés au Bleu de Coomassie.

2.2.7 Dosage de l'activité chitosanolytique

L'activité chitosanolytique a été évaluée par la méthode standard décrite par Boucher et al. (1995). L'unité d'activité enzymatique (U) = quantité d'enzyme requise pour relâcher l'équivalent de 1µmole de D-glucosamine en 1 min. à 37°C dans les conditions de réaction

enzymatique suivante: 1 ml de solution chitosane 0.08%; 50mM de tampon acétate à pH 5.5; incubation totale de 10 min. à 37°C.

Les concentrations de sucres réducteurs ont été mesurés par la méthode Nelson-Somogyi (Spiro, 1966) et les résultats ont été interprétés à l'aide d'une courbe standard de D-glucosamine, linéaire entre 0.1 et 1.0 mM.

2.3 Étude de l'activité enzymatique en bioréacteur

2.3.1 Immobilisation des enzymes de fusion sur la cellulose

Les enzymes de fusion ont été immobilisées sur des particules de cellulose microcristallines par simple contact des surnageants avec celles-ci. En général, 3.5 g de cellulose était mis en contact avec 400 ml de surnageant pendant 1h30, à 4 °C , à un pH de 7.0 et avec agitation. La cellulose est alors récupérée par centrifugation et lavée 3 fois avec une solution d'acétate de sodium (50 mM, pH 5.5).

2.3.2 Montage des bioréacteurs de type colonne

Les bioréacteurs utilisés dans cette étude étaient tous de type colonne. Leur montage a été réalisé dans des colonnes Pharmacia de 26 mm de diamètre. Au fond des colonnes se trouve un treillis de plastique recouvert d'un filtre de 10 µm de porosité. La cellulose a été déposée et décantée sur ce filtre fin. Après une décantation d'environ 30 min, la colonne de cellulose atteignait environ 3 cm de hauteur. L'adaptateur supérieur a ensuite été inséré dans la colonne et rapproché à environ 1 cm de la cellulose. Cet adaptateur supérieur était aussi muni d'un filtre de 10 µm de porosité. Ce montage est représenté schématiquement à la figure 2.8.

La circulation du substrat était assurée par l'action d'une pompe péristaltique Pharmacia (modèle P-1). Ce substrat consistait en une solution de chitosane 0.1% dans un tampon d'acétate de sodium (50 mM, pH 5.5) et contenait 0.02% d'azide de sodium. Les débits appliqués variaient entre 3 et 80 ml/h.

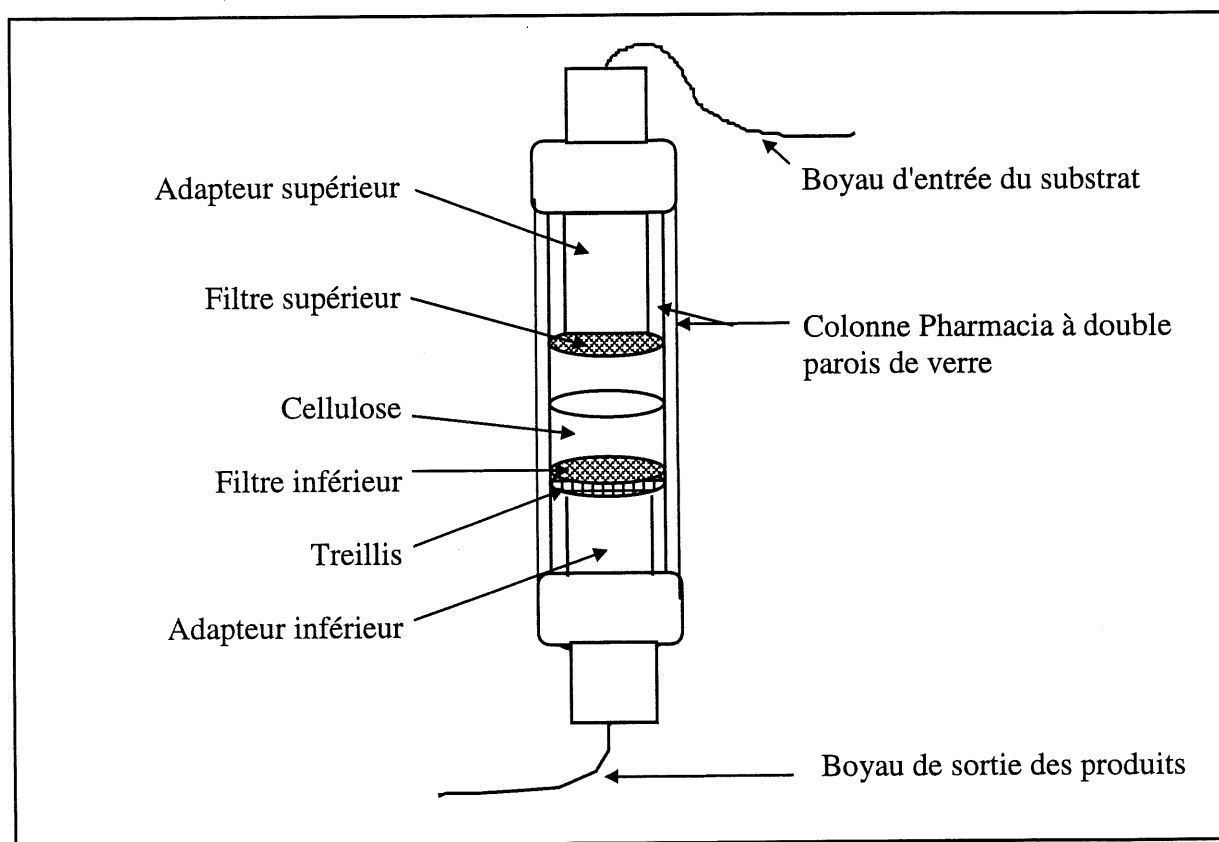


Figure 2.8 Représentation schématique du montage d'un bioréacteur de type colonne. Le montage est effectué dans une colonne Pharmacia de 26 mm de diamètre.

2.3.3 Dosage des sucres réducteurs des solutions de chitosane

Les quantités de sucres réducteurs des solutions de chitosane ont été dosées avant et après leur passage dans les bioréacteurs. Ces dosages ont été effectués avec le réactif PAHBAH (p-Hydroxy-benzoic acid hydrazide) à une concentration de 0.25%, en suivant la méthode décrite par Lever (1972). Les résultats ont été interprétés à l'aide d'une courbe standard de D-glucosamine, linéaire entre 0.1 et 1.0 mM.

Dans ce cas, le dosage à l'aide du réactif PAHBAH a été préféré au dosage par la méthode de Nelson-Somogyi parce qu'il est plus sensible et plus simple à réaliser. Toutefois, il nous est impossible d'utiliser le dosage à l'aide du réactif PAHBAH pour quantifier la production microbiologique d'enzymes (tel que décrit à la section 2.2.7) car ce dosage est trop sensible à la présence des nombreuses molécules réductrices dans les surnageants de culture.

2.3.4 Analyse préliminaire par chromatographie liquide à haute pression (HPLC)

Les résultats préliminaires d'analyses par HPLC ont été obtenus à l'aide d'une colonne de filtration sur gel TSK-GEL G3000PW_{XL} (de SUPELCO, USA), avec une phase mobile composée d'une solution de sodium-acétate 200 mM à pH 5.0 (filtrée et dégazée). Un détecteur à indice de réfraction de type ELS Sedex55 (de SEDERE, Alfortville, France) couplé au programme d'intégration des données STAR (de VARIAN, USA) a permis d'analyser les résultats de la séparation chromatographique.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Constructions génétiques

La portion codante du gène de la chitosanase de *Streptomyces sp.* N174 est longue de 834 nucléotides et code pour une protéine de 278 a.a. Les 40 a.a. en position N-terminale de cette protéine jouent le rôle de peptide signal et sont clivés lors de la sécrétion de l'enzyme. La protéine mature est donc formée de 238 a.a. Dans ce travail, les a.a. seront numérotés à partir du premier a.a. formant le début du peptide signal jusqu'au dernier a.a. composant l'extrémité C-terminale des protéines matures.

3.1.1 Construction du plasmide pBP251, porteur du gène de fusion *csn-g-xbd*

Les procédures utilisées pour la construction du plasmide pBP251 sont représentées à la figure 3.1.

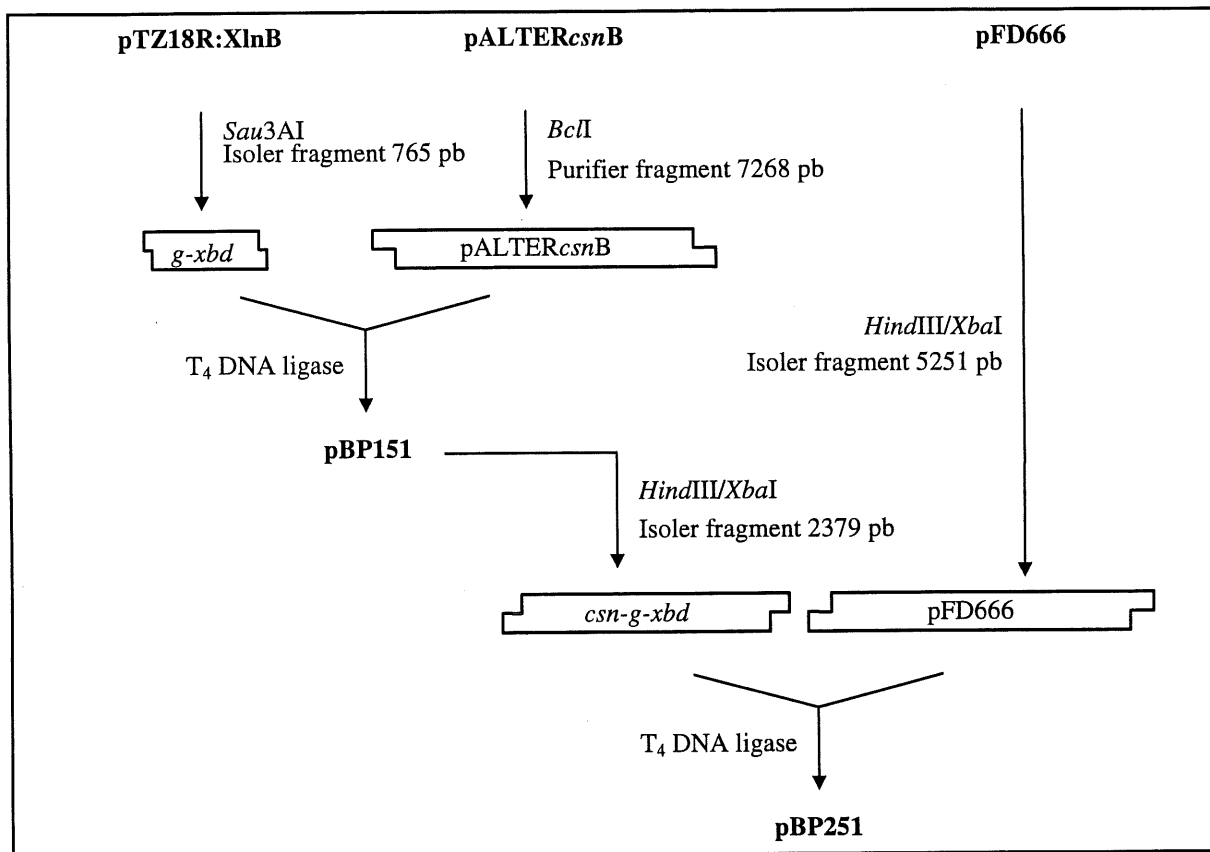


Figure 3.1: Construction du plasmide pBP251, porteur du gène de fusion *csn-g-xbd*.
 Les plasmides sous leur forme circulaire sont identifiés en caractères gras. Les boîtes rectangulaires représentent les fragments d'ADN linéaires obtenus par traitements enzymatiques des plasmides circulaires.

3.1.1.1 Construction du plasmide pBP151

Cette construction a été obtenue par juxtaposition du module *g-xbd* au module *csn* contenu dans le vecteur pALTER*csnB*.

Le module génétique *g-xbd* a été isolé par digestion *Sau3AI* du plasmide pTZ18R:XlnB. Les produits de cette digestion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et le fragment de 765 pb contenant le module *g-xbd* a été purifié par la méthode GENE CLEAN.

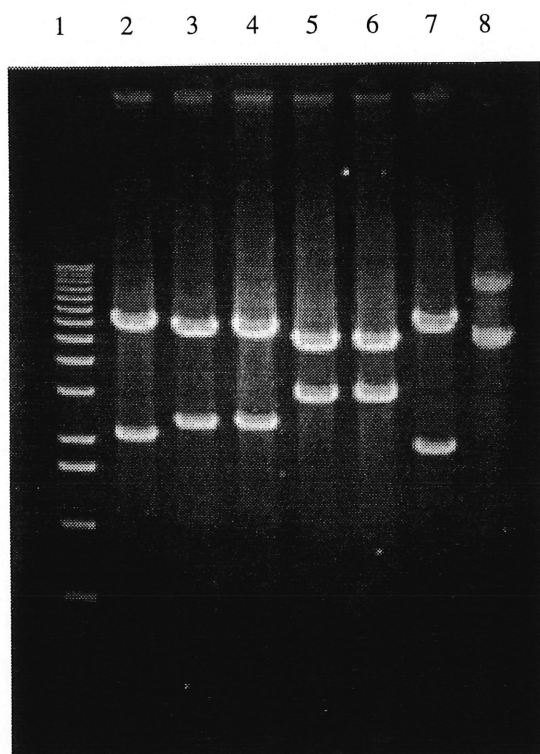
Parallèlement, le plasmide pALTER-*csnB*, porteur d'un site de restriction *BclI* unique, situé à l'extrémité 3' du gène *csn*, a été digéré par l'enzyme de restriction *BclI* puis traité à la phosphatase alcaline. Pour éliminer toutes traces d'enzyme (*BclI* et phosphatase alcaline), le produit de ces réactions a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose et purifié la méthode GENE CLEAN.

Les deux fragments d'ADN (module *g-xbd* et plasmide pALTER-*csnB* linéarisé) ont été ligués. Les produits de cette manipulation ont été transformés dans *E. coli* JM109. Des transformants ont été choisis au hasard et leurs ADNs plasmidiques ont été extraits et analysés par digestions enzymatiques. Un clone candidat porteur d'un seul insert, orienté correctement a été obtenu et nommé pBP151. La figure 3.2 présente une analyse du patron de restriction de ce clone candidat et la carte physique du plasmide est présentée à la figure 3.3.

3.1.1.2 Construction du plasmide pBP251

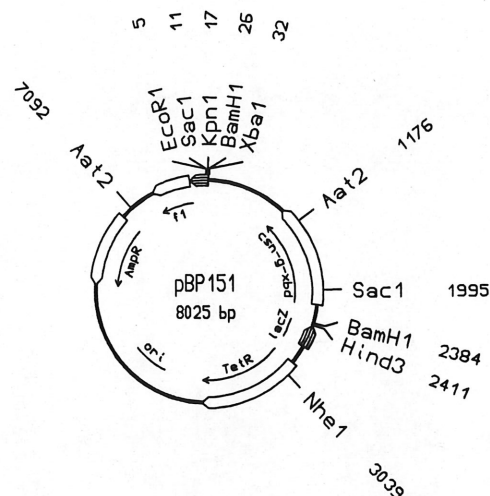
Cette construction a été obtenue par transfert du gène *csn-g-xbd* du plasmide pBP151 au plasmide pFD666. Le transfert des gènes de fusion dans le plasmide pFD666 permet l'expression de ces gènes dans *Streptomyces lividans* TK24.

Pour réaliser ce transfert les plasmides pBP151 et pFD666 ont été digérés par les enzymes de restriction *Hind*III et *Xba*I. Les produits de ces digestions ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments de 2373 pb et de 5646 pb respectivement porteurs du gène de fusion et du vecteur pFD666 linéarisé, ont été purifiés par la méthode GENE CLEAN puis ligués entre eux. Les produits de cette ligation ont été transformés dans *E. coli* DH5 α F'. Des transformants ont été choisis au hasard et leurs ADNs plasmidiques ont été extraits et digérés par différentes enzymes de restriction. Les fragments d'ADN ainsi générés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette analyse du patron de restriction permet de valider la construction génétique. Un clone candidat porteur d'un seul gène de fusion, correctement orienté, a été obtenu et nommé pBP251. Une analyse du patron de restriction de ce clone candidat est présentée sur la figure 3.4 et la carte physique du plasmide est présentée à la figure 3.5. La séquence en acides nucléiques du gène de fusion et la séquence en acides aminés déduite de la protéine de fusion sont présentées à la figure 3.6.



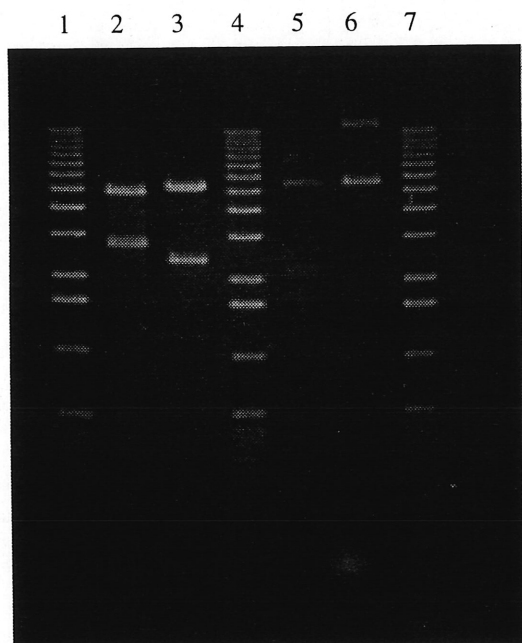
- 1- Kb DNA Ladder
- 2- pBP151 digéré par *AatII*
- 3- pBP151 digéré par *BamHI*
- 4- pBP151 digéré par *HindIII* et *XbaI*
- 5- pBP151 digéré par *NheI* et *KpnI*
- 6- pBP151 digéré par *NheI* et *EcoRI*
- 7- pBP151 digéré par *SacI*
- 8- pBP151 non digéré

A



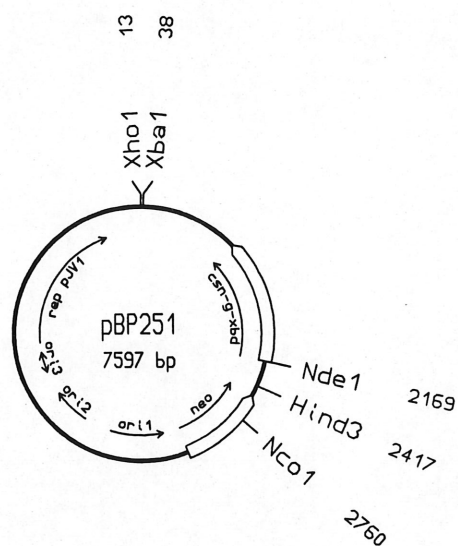
B

Figure 3.2: Analyse du patron de restriction du clone candidat à la construction de pBP151. A) Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de digestions du plasmide pBP151. B) Positions des sites de restriction impliqués dans l'analyse.



- 1- Kb DNA Ladder
- 2- pBP251 digéré par *XhoI* et *NcoI*
- 3- pBP251 digéré par *XbaI* et *HindIII*
- 4- Kb DNA Ladder
- 5- pBP251 digéré par *NheI* et *XhoI*
- 6- pBP251 non digéré
- 7- Kb DNA Ladder

A



B

Figure 3.4 Analyse du patron de restriction du clone candidat à la construction de pBP251. A) Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de digestions du plasmide pBP251. B) Positions des sites de restriction impliqués dans l'analyse.

GGATCCGTCGCGGGCGGGGCCCTCTGCGTGTCCGGGCTCCTCTGCGTGAGCCGGAGTCTGACGGTCCGTCACTTCGGTGGCGGATCGTT 90
GGCATGCGCGCGGTCAAGGATTGGGGCGGGCCCTTCGGAGGGCCGGAGGGGGCGCTTGAATCGGTTAGGAAAGTTTCTTAACCTCTC 180
TCTGCGGGCACCCCATGCCAGCGACAGAAGACGGAGCGTCATATGCACCTCGCAGCACCGGACCGCACGCATCGCCCTGGCCGTCGTCC 270
M H S Q H R T A R I A L A V V 15
TCACCGCGATACCCGCATCGCTCGCCACCGCGGAGTCCGGCTACGCTCCACTCAGCGGAGCACCGCCGTCAAGGCCGGTGGCGGCTCG 360
L T A I P A S L A T A G V G Y A S T Q A S T A V K A G A G L 45
ACGATCCCCACAAGAAGGAGATCGCGATGGAGCTCGTCTCCAGCGCCGAGAACTCCTCCCTCGACTGGAAGGCCAGTACAAGTACATCG 450
D D P H K K E I E M A L V S S A E N S S L D W K A Q Y K Y I 75
AGGACATCGGTGACGGCCCGGGCTACACCGCGCGCATCATCGGCTTCTGTTCCGGGACCGCGCATGCTGGAACCTCGTCCAGCACTACA 540
E D I G D G R G Y T G G I I G F C S G T G D M L E L V Q H Y 105
CCGACCTGGAGCCCGGCAACTCCTCGCCAAGTACCTGCCCGCGTGAAGAAGGTCAACGGCTCGGCCCTCCACTCCGGCTCGGCACCC 630
T D L E P G N I L A K Y L P A L K K V N G S A S H S G L G T 135
CGTTACCAAGGACTGGGCGACCGCGCCGAAGGACACCGTCTTCCAGCAGGCCAGAAGCAGCAGCGCGACCGGGTCTACTTCGACCCGG 720
P F T K D W A T A A K D T V F Q Q A Q N D E R D R V Y F L K 165
CCGTGAGCGCGCAAGGCCGCGCTGCGCGCGCTGGGCCAGTTCGCTTACTACGACGCCATCGTGATGCACGGCCCGGCAACGACC 810
A V S Q A K A D G L R A L G Q F A Y Y D A I V M H G P G N D 195
CGACCAAGCTTCGGTGGCATCCGCAAGACCGCCATGAAGAAGGCCAGGACCCCGCCAGGGCGGCGACGAGACCACCTACCTCAACGCCT 900
P T S F G G I R K T A M K K A R T P A Q G G D E T T Y L N A 225
TCCTGGACGCCGCAAGGCCGCGCATGCTCACCGAGGCCGCGCAGCAGCACCAGCCGCGTGGACACCGAGCAGCGGGTCTTCCTGAAGG 990
F L D A R K A A M L T E A A H D D T S R V D T E Q R V F L K 255
CCGGCAACCTCGACCTCAACCCGCGCTGAAGTGAAGACCTACGGGGACCCGTACGTGATCATGGCCACCGAGGGCTACCGAGCAGCG 1080
A G N L D L N P P L K W K T Y G D P Y V I M A T E G Y O S S 285
GCACGTCCAGCATCAACGTGCGCGGACCGCGCGCGGTGACAGCGCGCGCGGCAACGGGGCGGTGGCGCGGGTGACCGCCACGG 1170
G T S S I N V G G T G G G D S G G G D N G G G G G G C T A T 315
TGTCGCGCGGCGAGAAGTGGGGCGACCGGTACAACCTCGACGTCTCCGTGAGCGCGCGCGGACTGGACGGTGACGATGAACGTGCGGT 1260
V S A G Q K W G K T Y N L D V S V S G A S D W T V T M N V P 345
CCCCGGCGAAGTCTGTGGAACGTCAACGCCAGCTATCCAGTGCAGCAGCTGACCGCCAGGCTGAACGGCAGCGGCAACA 1350
S P A K V L S N W N V N A S Y P S A Q T L T A R L N G S G N 375
ACTGGGCGCCACCATCCAGGCCAACCGGAACCTGGACCTGGCCCGCGGTGCTCTGACGCGCGGGGTGACCCACCCACCGCGGAGAGGA 1440
N W G A T I Q A N A N W T W P S V S C S A G * 397
GGAATCACTCGCATCGGTACCGTACCGGACCGCGCGTCTCGCGCACCTGCGCACCTGGCTTCCGGCGTCCCGCTCACCGCGCTC 1530
GCCCGCGCGGCGCGGTGGCGGCGCGCGCGCCCGCGCCAGGCGCGCGCTGCAACGGTTACGTGGGCTCACCTTCGACGACGCGCCC 1620
TCCGGCAGCACCCAGTCCCTGCTCAACGCGCTCAGGCAGAACGGGCTGCGGGCCACCATGTTCAACAGGGGCGAGTACGCGCGCCAGAAC 1710
CCGTCCCTGCTCCGGGCGCGGTCGACGCGCGCATGTGGGTGCGCAACACAGCTACACCCACCGCACATGACCCAGCTCGGCCAGGCC 1800
CAGATGGACTCGCAGATCAACAGCTGAGCCGGCTCGTCCCGGTGCGGCGAGCGACACCCCGCGCACCGGGGCGACGCGCGGGATCG 1890
ATCGGCGCGCGAGCGCAGCTCGGACCTGGTTCCGGGCTGTCCGGCCGCTGCGGTGTTCTGCGGCTGTTCGGTCTGTTCGGGCACTC 1980
GAAATGTCCGGCGGAGTGCGGGCGGTGCCGTAGCGTGGTCCGCATGACGCTCCCTCCCGTACCCGCGCGCTACGACCGCGATGA 2070
GCGCAGCAGTTGATCGCCTGGTGGACATGACGCGGGCGGTGCTCCCATCTGCGGTGGGTCGAGCACTGCTGGTTGAGGTGATGCTGAC 2160
GGTGATCCGACCTCGCCCCGTGATGACTGCGCGCGGGTGGTCTCCCATCTGCGGTGGGTCGAGCACTGCTGGTTGAGGTGATGCTGAC 2250
GGGGCGCCCGCGGACCGGACCGCAGTTCGACGAGAGCATCGAGGACGCGGACATGCGGGTGGAGGGCGTCCCGCTGGAGCGACTGCTGCA 2340
2341

Figure 3.6: Séquence génétique du gène de fusion *csn-g-xbd* et séquence d'acides aminés déduite.
La composition en a.a. est la suivante: 1-40 peptide signal et 41-276 module catalytique CSN de *Streptomyces sp.* N174; 277-292 portion de la *xylanaseB*, 293-310 espaceur riche en glycine et 311-397 domaine d'attachement XBD de *S. lividans*; Le site de clivage du peptide signal est indiqué par une flèche simple. Le domaine d'attachement au xylane est souligné. La région jouant le rôle d'espaceur entre les modules CSN et XBD est soulignée d'une ligne double.

3.1.2 Construction du plasmide pBP201, porteur du gène de fusion *csn-g-cbd*_{Cex}

Les procédures utilisées pour la construction de ce plasmide sont représentées par la figure 3.7.

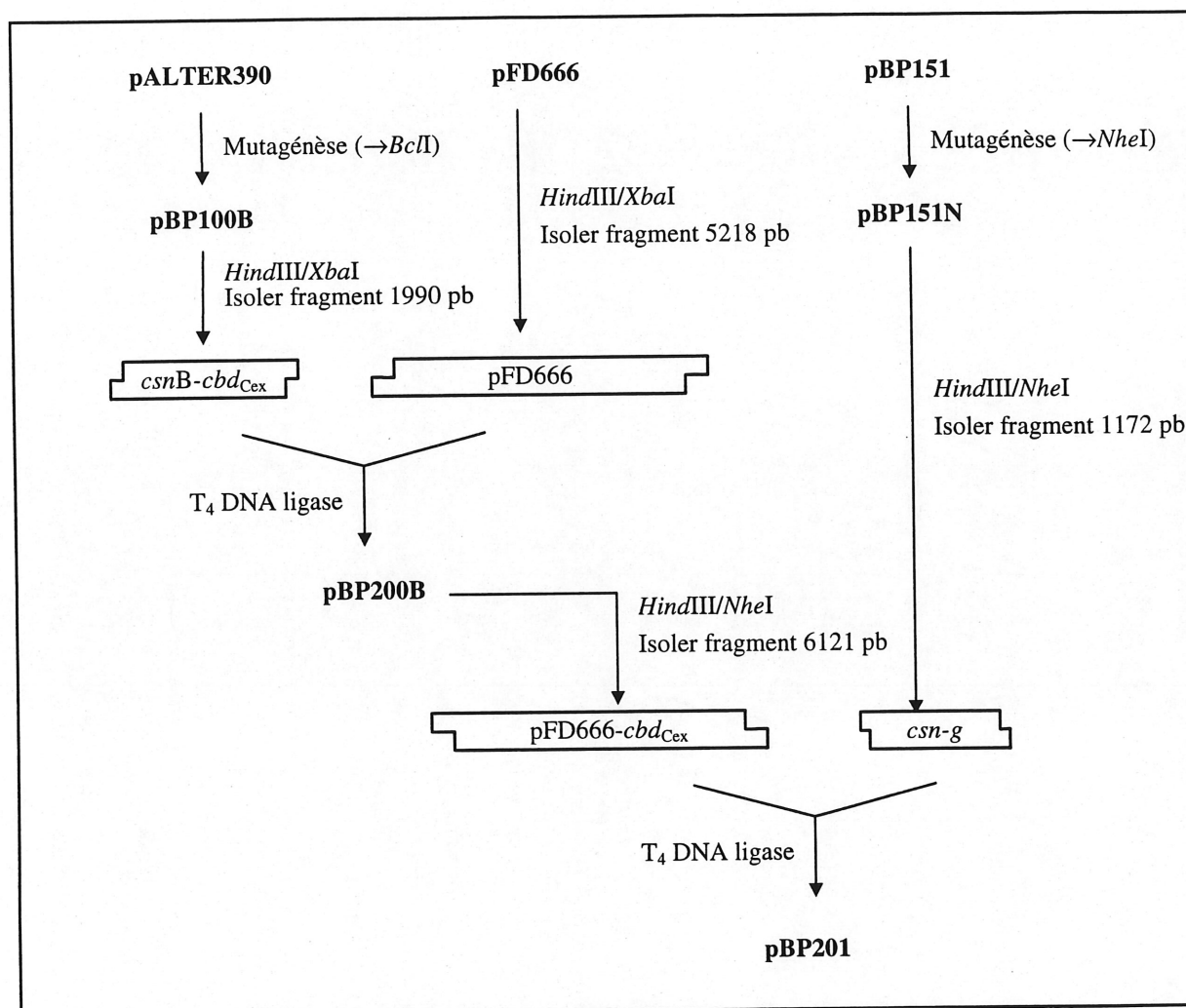


Figure 3.7: Construction du plasmide pBP201, porteur du gène de fusion *csn-g-cbd*_{Cex}.

Les flèches (→) indiquent les sites de restriction créés par mutagénèse. Les plasmides sous leur forme circulaire sont identifiés en caractères gras. Les boîtes rectangulaires représentent les fragments d'ADN linéaires obtenus par traitements enzymatiques des plasmides circulaires.

3.1.2.1 Mutagénèse dirigée de pALTER390

Pour permettre la construction du gène de fusion *csn-g-cbd_{Cex}*, un site de restriction *Bcl*I a été créé, par mutagénèse dirigée, entre les modules *csn* et *cbd_{Cex}* du gène de fusion *csn-cbd_{Cex}* porté par le plasmide pALTER390.

Cette mutagénèse a été effectuée en suivant une adaptation du protocole proposé par Deng et Nickoloff (1992). Le site de restriction *Bcl*I créé se situe à la jonction des domaines *csn* et *cbd_{Cex}* du gène de fusion *csn-cbd_{Cex}* et il est unique dans ce gène. Il est également absent dans les vecteurs pUC19 et pALTER, d'où l'intérêt de ce site pour transférer les modules génétiques d'un plasmide à un autre. La mutagénèse a été effectuée sur l'ADN simple brin du plasmide pALTER390, obtenu par dénaturation thermique de 5 min. dans un bain d'huile minérale à 110°C. L'oligonucléotide permettant d'introduire la mutation possède la séquence suivante:



Le nucléotide souligné est non complémentaire à la séquence originale. Cette mutation n'est pas silencieuse quant à la séquence d'acide aminés de la protéine de fusion. Elle amène le changement d'un acide aminé glycine en arginine à la position 277 de la protéine de fusion.

Tel que décrit à la section 2.1.9, deux autres oligonucléotides ont été utilisés lors de cette réaction de mutagénèse: l'oligonucléotide AMP, complémentaire sur toute sa séquence à une région du plasmide pALTER (région AMP) et l'oligonucléotide *Eco*RV (5' TTGCGGGATATTGTCCATTCCGA 3') qui provoque une mutation silencieuse dans le gène de résistance à la tétracycline (Tet R) du plasmide pALTER tout en permettant d'éliminer un site de restriction *Eco*RV unique et non essentiel à la poursuite de nos travaux. Les positions des régions homologues aux trois oligonucléotides impliqués sont indiquées à la figure 3.8.

Cette mutation mène à la création d'un nouveau plasmide nommé pBP100B, porteur du gène de fusion *csnB-cbd_{Cex}*. La présence du site *Bcl*I unique a été confirmée par électrophorèse des produits de digestions de pBP100B. Les résultats de cette analyse sont présentés à la figure 3.8.

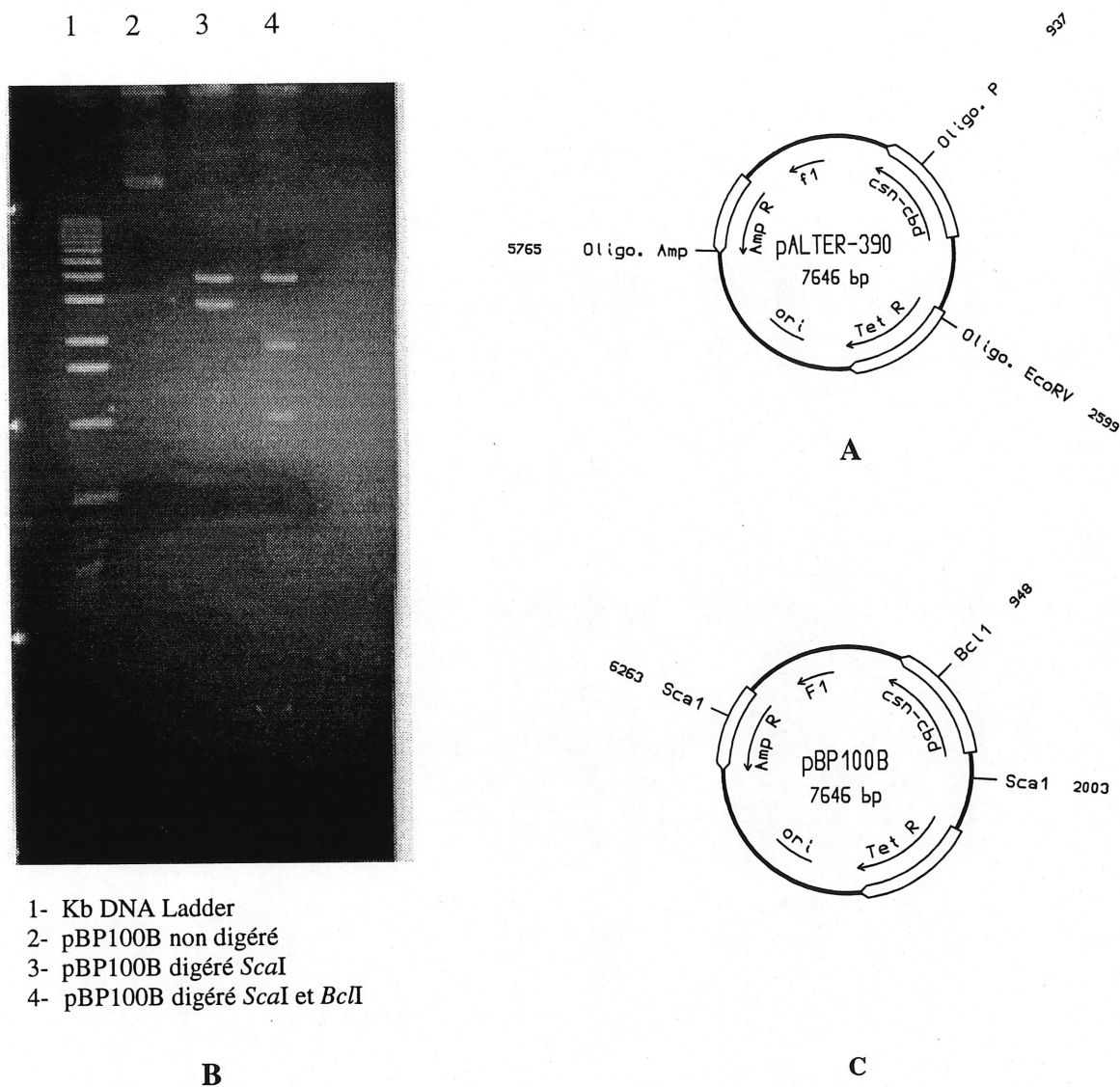


Figure 3.8: Analyse du patron de restriction du clone candidat à la construction de pBP100B. A) Régions homologues aux oligonucléotides impliqués dans la mutagenèse de pALTER390. B) Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de digestions du plasmide pBP100B. C) Positions des sites de restriction impliqués dans l'analyse du patron de restriction.

3.1.2.2 Construction du plasmide pBP200B

Cette construction est obtenue par transfert du gène de fusion *csnB-cbd_{Cex}* de pBP100B au plasmide pFD666.

Le gène de fusion *csnB-cbd_{Cex}*, porteur du site de restriction *BclI* unique situé à la jonction des deux modules, a été transféré du plasmide pBP100B au plasmide pFD666 donnant naissance à un nouveau plasmide nommé pBP200B.

Pour permettre ce transfert les plasmides pBP100B et pFD666 ont été digérés par les enzymes de restriction *HindIII* et *XbaI*. Les produits de ces digestions ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments de 1990 pb et de 5218 pb respectivement porteurs du gène de fusion et du vecteur pFD666 linéarisé, ont été purifiés par la méthode GENE CLEAN puis ligués entre eux. Les produits de ligation ont été transformés dans *E. coli* DH5 α F'. Des transformants ont été choisis au hasard et leurs ADNs plasmidiques ont été extraits et digérés par différentes enzymes de restriction. Les fragments d'ADN ainsi générés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette analyse du patron de restriction permet de valider la construction génétique. Un clone candidat porteur d'un seul insert, correctement orienté, a été obtenu et nommé pBP200B. La carte physique de ce plasmide est présentée en annexe 1.

3.1.2.3 Mutagenèse dirigée de pBP151

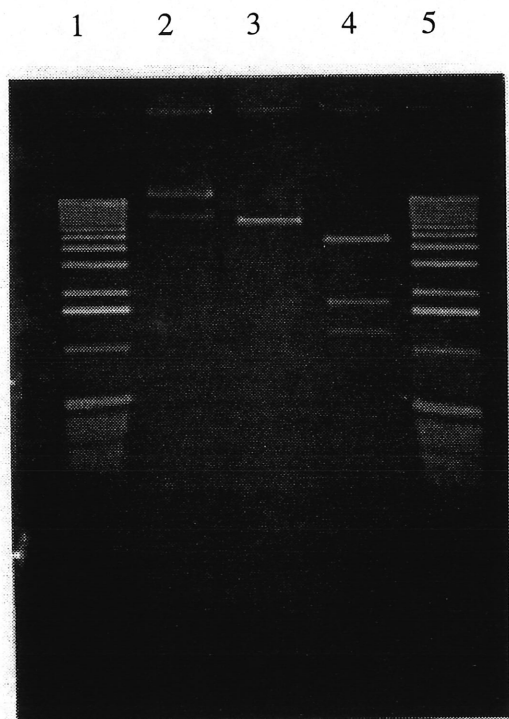
Cette deuxième mutagenèse a permis d'introduire un site *NheI* unique entre les modules *g* et *xbd* du gène de fusion *csn-g-xbd*. Cette mutation a été effectuée sur l'ADN simple brin du plasmide pBP151 à l'aide de l'oligonucléotide suivant:

5' GCACCCGCCGCTAGCGCCCCCGTTG 3'

Les nucléotides soulignés ne sont pas complémentaires à la séquence avant mutagenèse. Cette mutation amène également le changement des acides aminés 308 et 309 de la protéine de fusion. Ces a.a. passent respectivement d'une glycine à une alanine et d'une glycine à une sérine.

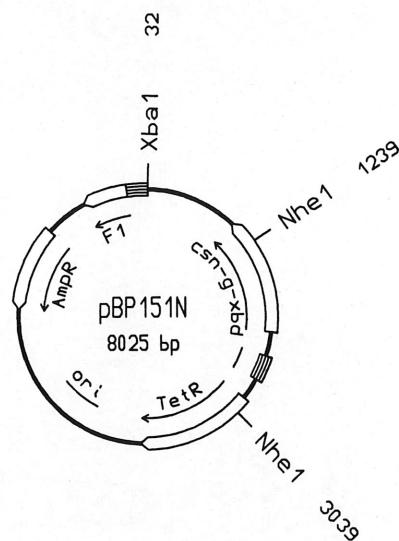
Tel que décrit à la section 2.1.9, les oligonucléotides AMP et *EcoRV* ont aussi été introduit dans le mélange réactionnel. L'ADN sb a été produit par dénaturation thermique de pBP151 incubé 8 minutes dans un bain d'huile à 110°C.

Le nouveau plasmide issu de cette manipulation a été nommé pBP151N et la présence du site de restriction *NheI*, unique dans le gène de fusion, a été démontrée par électrophorèse des produits de digestions de ce plasmide (figure 3.9).



- 1- Kb DNA Ladder
- 2- pBP151N non digéré
- 3- pBP151N digéré *NheI*
- 4- pBP151N digéré *NheI* et *XbaI*
- 5- Kb DNA Ladder

A



B

Figure 3.9: Analyse du patron de restriction du clone candidat à la construction de pBP151N. A) Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de digestions du plasmide pBP151N. B) Positions des sites de restriction impliqués dans l'analyse.

3.1.2.4 Construction du plasmide pBP201

Cette construction est obtenue suite à la juxtaposition du module *csn-g* au module *cbd*_{Cex}. Pour ce faire, les plasmides pBP200B et pBP151N ont été digérés, dans un même mélange réactionnel, par les enzymes de restriction *Hind*III et *Nhe*I. Les enzymes ont ensuite été inactivées à la chaleur. Le mélange réactionnel a ensuite été soumis à l'action de la T4 DNA Ligase et les produits de ligation ont été transformés dans *E. coli* DH5 α F'. Les clones candidats obtenus suite à ces manipulations ont été sélectionnés une première fois sur milieu LB-Agar contenant de l'ampicilline. Puis, quelques-uns des clones candidats, choisis au hasard, ont subi une deuxième sélection par repiquage des colonies sur milieu LB-Agar contenant de la tétracycline. Les clones candidats résistants à cet antibiotique ont été rejetés puisque leurs ADNs plasmidiques portaient une partie du plasmide pBP100B non désirée qui correspond au vecteur linéarisé plutôt qu'au gène de fusion. Les ADNs plasmidiques des clones candidats résistants à l'ampicilline mais non résistants à la tétracycline ont été extraits et les produits de leur digestions enzymatiques ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Un clone candidat porteur d'un seul insert, correctement orienté, a été obtenu et nommé pBP201. La carte physique de ce plasmide est présentée à la figure 3.10. La séquence en acides nucléiques du gène de fusion et la séquence en acides aminés déduite de la protéine de fusion sont présentées à la figure 3.11.

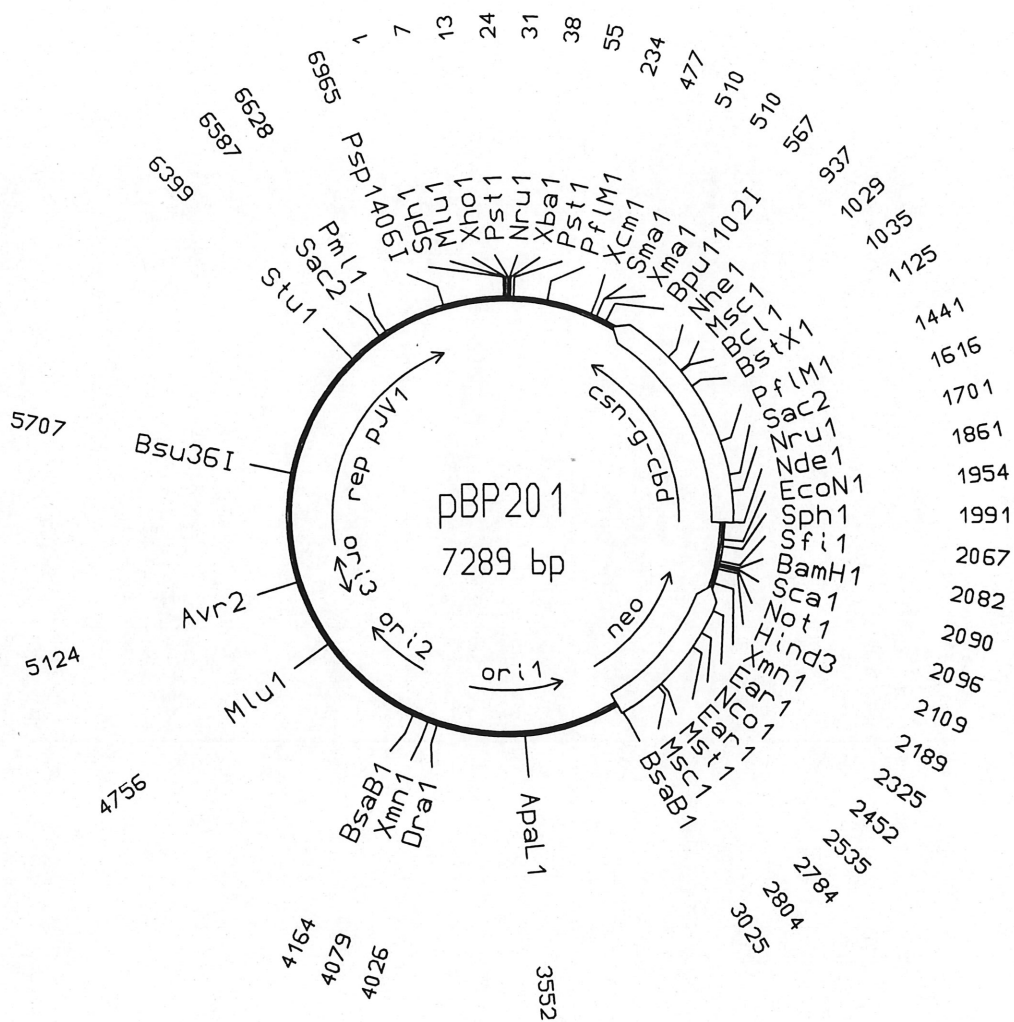


Figure 3.10: Carte physique du plasmide pBP201. Seuls les sites de restriction présents à deux positions ou moins sont représentés. ori1 = origine de répllication d'*E. coli* ; ori2 = origine de répllication du phage M13 ; ori3 = origine de répllication du plasmide pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes* ; neo : gène de résistance à la kanamycine (Denis et Brzezinski, 1992).

GGATCCGTCGGGGCGGGGCCCCCTCTGCGTGTCCGGGCTCCTCTGCGTGAGCCGGAGTCTGACGGTCCGTCACCTCGGTGGCGGATCGTT 90
 GGCATGCGCGCGGTACAGGATTTGGGGCGGGCCCTTGCAGAGGGCCGGAGGGGGCGCTTGAATCGGTTAGGAAAGTTTCTTAACCTCTC 180
 TCTGCGGGCACCCCATGCCAGCGACAGAAAGACGGAGCGTCATATGCACCTCGCAGCACCGGACCGCACGCATCGCCCTGGCCGTCGTCC 270
 M H S Q H R T A R I A L A V V 15
 TCACCGCGATACCCGCATCGCTCGCCACCGCCGGAGTCCGCTACGCCTCCACTCAGCGGAGCACCGCCGTCAGGCGCGGTGCGGCCCTCG 360
 L T A I P A S L A T A G V G Y A S T Q A S T A V K A G A G L 45
 ACGATCCCCACAAGAAGGAGATCGCGATGGAGCTCGTCTCCAGCGCCGAGAACTCCTCCCTCGACTGGAAGGCCAGTACAAGTACATCG 450
 D D P H K K E I E M A L V S S A E N S S L D W K A Q Y K Y I 75
 AGGACATCGGTGACGGCCCGGCTACACCGCGGCATCATCGGCTTCTGTTCGGGACCGGCGACATGCTGGAAGTCTCGTCCAGCACTACA 540
 E D I G D G R G Y T G G I I G F C S G T G D M L E L V Q H Y 105
 CCGACCTGGAGCCCGGCAACATCTCGCCAAGTACCTCGCCGCGCTGAAGAAGGTCAACGGCTCGGCCTCCCACTCCGGCCTCGGCACCC 630
 T D L E P G N I L A K Y L P A L K K V N G S A S H S G L G T 135
 CGTTCACCAAGGACTGGGCGACCGCCGCAAGGACACCGCTCTTCCAGCAGGCCGAGACGAGCGGACCGGGTCTACTTCGACCCGG 720
 P F T K D W A T A A K D T V F Q Q A Q N D E R D R V Y F D P 165
 CCGTCAGCCAGGCGAAGGCCGACGGCTGCGCGCGCTGGGCGAGTTCGCTACTACGAGCCATCGTGATGACGCGCCCGGCAACGACC 810
 A V S Q A K A D G L R A L G Q F A Y Y D A I V M H G P G N D 195
 CGACAGCTTCGGTGGCATCCGCAAGACCGCCATGAAGAAGGCCAGGACCCCGCCAGGGCGGCGACGAGACCACTACCTCAACGCCT 900
 P T S F G G I R K T A M K K A R T P A Q G G D E T T Y L N A 225
 TCCTGGACGCGCCGCAAGGCCCGCATGCTCACCAGGGCCGCGCAGCAGACACCGCCGCTGGACACCGAGCAGCGGGTCTTCCTGAAGG 990
 F L D A R K A A M L T E A A H D D T S R V D T E Q R V F L K 255
 CCGGCAACCTCGACCTCAACCCCGCGCTGAAGTGAAGACCTACGGGGACCCGTACGTGATCATGGCCACCGAGGGCTACCAGAGCAGCG 1080
 A G N L D L N P P L K W K T Y G D P Y V I M A T E G Y Q S S 285
 GCACGTCCAGCATCAACGTCCGCGGGGACCGCGCGGTGACAGCGCGCGCGGCGACAACGGGGCGCTAGCTCCGGTCCGGCCGGGTGCC 1170
 G T S S I N V G G T G G G D S G G G D N G G A S S G P A G C 315
 AGGTGCTGTGGGGCGTCAACCAAGTGAACACCGGCTTCAACCGCAACGTCAACCGTGAAGAACACGTCTCCGCTCCGGTCCGAGCGCTGGA 1260
 Q V L W G V N Q W N T G F T A N V T V K N T S S A P V D G W 345
 CGCTCAGCTTCAGCTTCCCGTCCGGCCAGCAGGTCAACCGCGGTGAGCTCGACGGTCAACGAGTCCGGCTCCGGCTCGGCGGTGACGGTCCGCA 1350
 T L T F S F P S G Q Q V T Q A W S S T V T Q S G S A V T V R 375
 ACGCCCCGTGGAACGGCTCGATCCCGCGGGCGGCACCGCGAGTTCGCTTCAACGGCTCGCACAGGGCACCAACGCCCGCGCGGACGG 1440
 N A P W N G S I P A G T A Q F G F N G S H T G T N A A P T 405
 CGTTCTCGTCAACGGCACGCCCTGCACGGTCCGGTGAACGGCCGTGGTCTCGTCCGGTCCCGACGGGCCGGGCACCGGGCCGGTGGTTCG 1530
 A F S L N G T P C T V G * 417
 CGCACGCCCGCGGTACCGGCCCGGCGCGTCTGCGTCGATACGCTGGGCCGATGAGCACCGACGCGGGCGACCGGACCACTACCTGC 1530
 TCGTCGACGGCGAGAACATCGACGCGACGCTGGGCTCGTCGATCTCGCGCGCCGGCGACTCCCGAGCAGCGCCCGCGCTGGGAGCGGG 1620
 TGCTGGGTTTCGCGCAGCAGGCGTGGGGCGAGCCGGTCAAGGCGCTGTCTTCTCAACGCGTCAACGGGTCCCTGCCGATGTCTGCTCG 1710
 TGCAGGCGCTGCTCGCGATCGGGTTACGCCCATCCCCCTGTCGGGCGAGTCGTACGAGAAGGTGCTCGACCTGCAG 1787

Figure 3.11: Séquence génétique du gène de fusion *csn-g-cbd_{cex}* et séquence d'acides aminés déduite. La composition en a.a. est la suivante: 1-40 peptide signal et 41-276 module catalytique CSN de *Streptomyces* sp. N174; 277-292 portion de la *xylanaseB* et 293-307 espaceur riche en glycine de *S. lividans*; 310-417 domaine d'attachement CBD_{cex} de *C. fimi*; 308-309 a.a. codés par la région mutée lors de la création d'un site de restriction *NheI* (étape intermédiaire). Le site de clivage du peptide signal est indiqué par une flèche simple. Le domaine d'attachement à la cellulose est souligné. La région jouant le rôle d'espaceur entre les modules CSN et CBD_{cex} est soulignée d'une ligne double.

3.1.3 Construction du plasmide pBP202, porteur du gène de fusion *csn-pt-cbd*_{Cex}

Ce plasmide porte le gène de fusion *csn-pt-cbd*_{Cex}. Les procédures utilisées pour sa construction sont représentées par la figure 3.12.

3.1.3.1 Construction du plasmide intermédiaire pUC19*csnB-cbd*_{Cex}

Cette construction est obtenue par transfert du gène de fusion *csnB-cbd*_{Cex} de pBP100B au vecteur pUC19. Le plasmide qui en résulte a l'avantage de présenter un seul site de restriction *Bcl*I et un seul site de restriction *Nhe*I qui sont fournis par le gène modulaire *csnB-cbd*_{Cex}. Cette caractéristique sera utile pour les trois constructions génétiques décrites dans la suite de ce texte.

Les ADNs plasmidiques pBP100B et pUC19 ont d'abord été digérés par les enzymes de restriction *Hind*III et *Xba*I. Les produits de ces réactions ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments de 1990 pb et de 2662 pb, respectivement porteurs du gène de fusion et du vecteur pUC19 linéarisé, ont été purifiés par la méthode GENE CLEAN puis ligués entre eux. Les produits de ligation ont été transformés dans *E. coli* GM272. Les ADNs plasmidiques de quelques-uns des clones candidats, choisis au hasard, ont été extraits puis analysés par digestions enzymatiques. Un clone candidat porteur d'un seul insert, correctement orienté, a été obtenu et nommé pUC19*csnB-cbd*_{Cex}. La carte physique de ce plasmide est présentée en annexe 1.

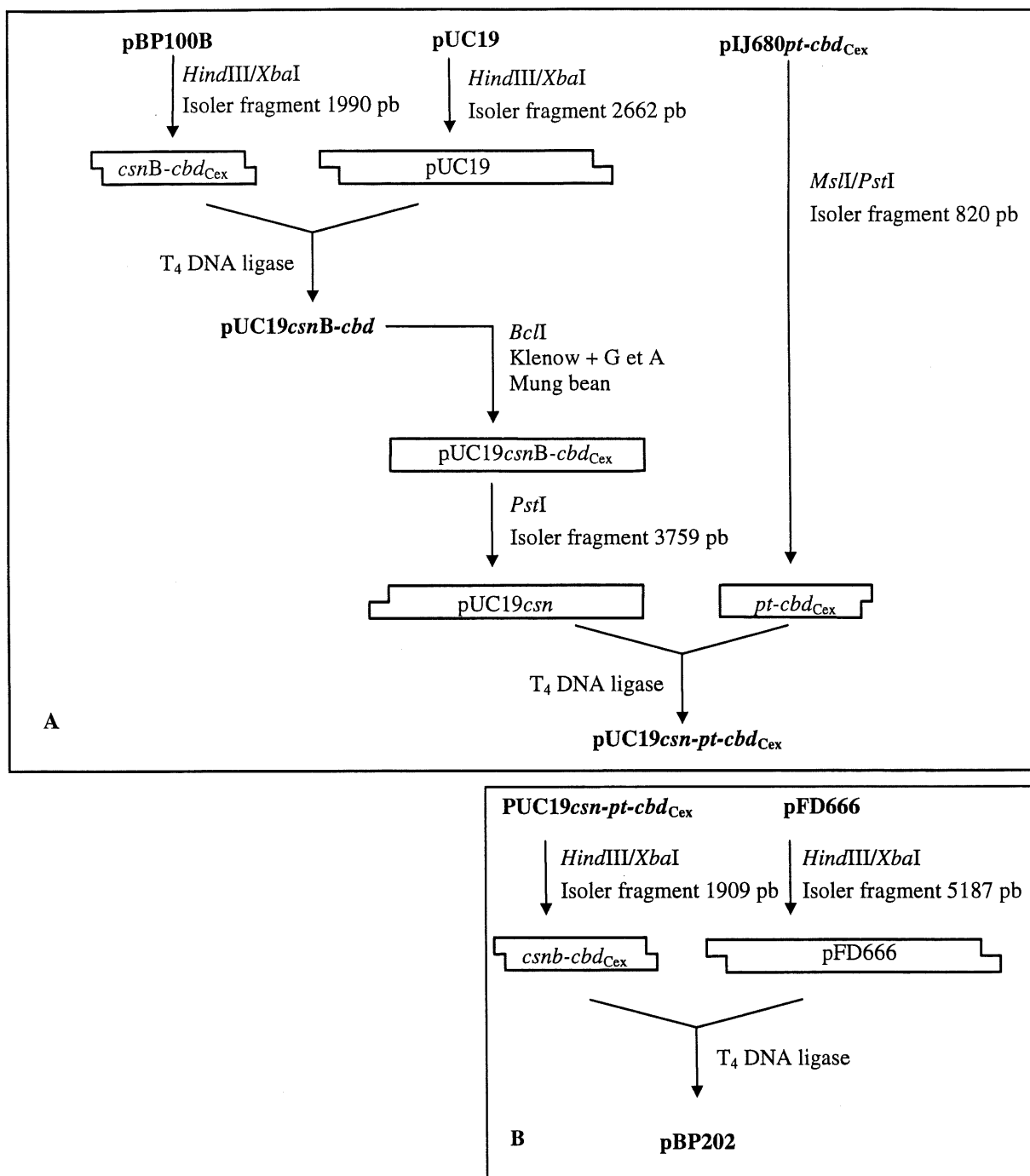


Figure 3.12: Construction du plasmide pBP202. A) Construction du plasmide intermédiaire $pUC19csn-pt-cbd_{Cex}$. B) Construction de pBP202 par transfert du gène de fusion $csn-pt-cbd$ dans pFD666. Les plasmides sous leur forme circulaire sont identifiés en caractères gras. Les boîtes rectangulaires représentent les fragments linéaires d'ADN obtenus par traitements enzymatiques des plasmides circulaires.

3.1.3.2 Construction du plasmide pUC19 csn - pt - cbd_{Cex}

Cette construction a été obtenue suite à la substitution du module cbd_{Cex} de pUC19 csn B- cbd_{Cex} par un module pt - cbd_{Cex} .

Le module pt - cbd_{Cex} a été isolé du plasmide pIJ680- pt - cbd_{Cex} par digestion *MspI* et *PstI*. Les produits de cette réaction enzymatique ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et le fragment d'ADN de 820 pb, porteur du module pt - cbd_{Cex} , a été extrait du gel par la méthode GENE CLEAN.

Le module cbd_{Cex} a été éliminé du plasmide pUC19 csn B- cbd_{Cex} tout en générant des extrémités compatibles à celles du module pt - cbd_{Cex} , et en conservant le bon cadre de lecture. Pour se faire, le plasmide a subi les traitements enzymatiques suivants:

D'abord une extrémité franche, compatible à celle générée par l'enzyme *MspI* lors de l'isolement du module pt - cbd_{Cex} , a dû être créée dans la région 3' du gène csn . Pour se faire, le plasmide pUC19 csn B- cbd_{Cex} a été digéré par l'enzyme de restriction *BclI*. Les extrémités cohésives générées par cette digestion ont ensuite été partiellement remplies par l'action du fragment Klenow de l'enzyme T4 DNA polymérase en présence des nucléotides dATP et dGTP seulement. L'ADN a ensuite été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose suivi d'une extraction par la méthode GENE CLEAN. Ensuite, pour compléter la production d'extrémités franches, l'ADN a été digéré par l'enzyme Mung Bean Nucléase, qui possède une activité exonucléase sur l'ADN simple brin. Une seconde fois, l'ADN a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose suivi d'une extraction par la méthode GENE CLEAN.

Finalement, une digestion *PstI* a permis d'exciser le module cbd_{Cex} du plasmide pUC19 csn B- cbd_{Cex} . Le plasmide a été séparé du module cbd_{Cex} par électrophorèse sur gel d'agarose et purifié par la méthode GENE CLEAN.

Ces procédures ont permis d'obtenir le fragment de 3759 pb, porteur du plasmide pUC19*csn*.

Les deux fragments d'ADN (module *pt-cbd*_{Cex} et plasmide pUC19*csn* linéarisé) ont ensuite été ligués à l'aide de l'enzyme T4 DNA ligase. Le produit de la ligation a été transformé dans *E. coli* JM109 et les ADNs plasmidiques de quelques transformants, choisis au hasard, ont été extraits puis analysés par digestions enzymatiques. Un clone candidat porteur d'un seul insert, correctement orienté, a été obtenu et nommé pUC19*csn-pt-cbd*_{Cex}. La carte physique de ce plasmide est présentée en annexe 1.

3.1.3.3 Séquençage partiel de pUC19*csn-pt-cbd*_{Cex}

La séquence de la région de ligation des extrémités cohésives a été vérifiée par séquençage manuel. L'ADN sb a été obtenu par traitement alcalin du plasmide pUC19*csn-pt-cbd*_{Cex}. Les produits des réactions de séquençage ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et exposés à une pellicule photographique.

3.1.3.4 Transfert du gène de fusion *csn-pt-cbd*_{Cex} dans le plasmide pFD666

Le gène de fusion *csn-pt-cbd*_{Cex} a été transféré dans le plasmide pFD666 pour permettre son expression dans *Streptomyces lividans* TK24.

Les plasmides pUC19*csn-pt-cbd*_{Cex} et pFD666 ont été digérés par les enzymes de restriction *Hind*III et *Xba*I. Les produits de ces digestions ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments de 1909 pb et de 5646 pb respectivement porteurs du gène de fusion et du vecteur pFD666 linéarisé ont été purifiés par la méthode GENE CLEAN puis ligués entre eux. Les produits de ligation ont été transformés dans *E. coli* DH5 α F'. Des transformants ont été choisis au hasard et leurs ADNs plasmidiques ont été extraits et digérés par différentes

enzymes de restriction. Les fragments d'ADN ainsi générés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette analyse du patron de restriction permet de valider la construction génétique. Un clone candidat porteur d'un seul gène de fusion, correctement orienté, a été obtenu et nommé pBP202. La carte physique de ce plasmide est présentée à la figure 3.13. La séquence en acides nucléiques du gène de fusion et la séquence en acides aminés déduite de la protéine de fusion sont présentées à la figure 3.14.

GGATCCGTCGGGGCGGGGCCCCCTCTGCGTGTCCGGGCTCCTCTGCGTGAGCCGAGTCTGACGGTCCGTCACCTTCGGTGGCGGATCGTT 90
GGCATGCGCGCGGTACAGGATTTGGGGCGGGCCCTTGGGAGGGCGGGAGGGGGCGCTTGAATCGGTAGGAAAGTTTCCTAACTCTC 180
TCTGCGGGCACCCCATGCCAGCGACAGAGACGGAGCGTCATATGCACTCGCAGCACCGGACCGCACGCATCGCCCTGGCCGTCGTC 270
M H S Q H R T A R I A L A V V 15
TCACCGGATACCCGCATCGCTCGCCACCGCCGGAGTCGGCTACGCCCTCCACTCAGGCGAGCACCGCCGTCAAGGCCGGTGGCGGCTCG 360
L T A I P A S L A T A G V G Y A S T Q A S T A V K A G A G L 45
ACGATCCCCACAAGAAGGAGATCGCGATGGAGCTCGTCTCCAGCGCGGAGAACTCCTCCCTCGACTGGAAGGCCAGTACAAGTACATCG 450
D D P H K K E I E M A L V S S A E N S S L D W K A Q Y K Y I 75
AGGACATCGGTGACGGCGCGGTACACCGCGGCATCATCGGCTTCTGTCCGGGACCGGCGACATGCTGGAAGTCTCGTCCAGCACTACA 540
E D I G D G R G Y T G G I I G F C S G T G D M L E L V Q H Y 105
CCGACCTGGAGCCCGGCAACATCCTCGCCAAAGTACCTGCCCGCGCTGAAGAAGGTCAACGGCTCGGCCTCCCACTCCGGCTCGGCACCC 630
T D L E P G N I L A K Y L P A L K K V N G S A S H S G L G T 135
CGTTCACCAAGGACTGGGCGACCGCCCAAGGACACCGTCTTCCAGCAGGCCGAGAAGCAGCAGCGCGACCGGGTCTACTTCGACCCGG 720
P F T K D W A T A A K D T V F Q Q A Q N D E R D R V Y F D P 165
CCGTGACCCAGGCGAAGGCCGACGGCTGCGCGCGCTGGGCGAGTTCGCTTACTACGACGCCATCGTGATGACCGGCCCGGCAACGACC 810
A V S Q A K A D G L R A L G Q F A Y Y D A I V M H G P G N D 195
CGACCGCTTCGGTGGCATCCGCAAGACCGCCATGAAGAAGGCCAGGACCCCCCGCCAGGCGCGGACGAGACCACTACCTCAACGCCCT 900
P T S F G G I R K T A M K K A R T P A Q G G D E T T Y L N A 225
TCCTGGACGCCCCGAAGGCCCATGCTCACCGAGGCGCGCAGCAGCAGCAGCGCGTGGACACCGAGCAGCGGGTCTTCTGTAAGG 990
F L D A R K A A M L T E A A H D D T S R V D T E Q R V F L K 255
CCGGCAACCTCGACCTCAACCCGCGCTGAAGTGAAGACCTACGGGGACCGGTACGTGATCGTGCTGCCCGCCAGGCCCTTCGCGCG 1080
A G N L D L N P P L K W K T Y G D P Y V I V L P A O A A F G 285
CGAGCCCGACGCGGACGCCACCGCGGACCGCCGACCGCCAGCAGCGCGGACCGCCGACCGTCCGGTCCGGCCGGGTGCCAGGTGC 1170
A S P T P T P T T P T P T P T P T P T S G P A G C Q V 315
TGTGGGGCGTCAACCAAGTGAACACCGGCTTCACCGCGAAGTCAACCGTGAAGAACAGTCTCCGCTCCGGTCCGAGCGGTGGACGCTCA 1260
L W G V N Q W N T G F T A N V T V K N T S S A P V D G W T L 345
CGTTCAGCTTCCCGTCCGGCCAGCAGGTACCCAGGCGTGGAGCTCGACGGTCAACGAGTCCGGCTCGGCGGTGACGGTCCGCAACGCC 1350
T F S F P S G Q Q V T Q A W S S T V T Q S G S A V T V R N A 375
CGTGAACCGGCTCGATCCCGCGGGCGGCGACCGCGAGTTCGGCTTCAACGGCTCGCACACGGGCACCAACCGCGCGCGGACGGCGTCT 1440
P W N G S I P A G G T A Q F G F N G S H T G T N A A P T A F 405
CGCTCAACGGCACGCCCTGCACGGTCCGGTACCGGGCGTCCGTCGTCGGTCCCGACGGGCGGCGACCGGGCGGTCGGTTCGCGCACG 1530
S L N G T P C T V G * 415
CCGCGCGGTACCGGCCCGGCGCGCTCTGCGTCGATACGCTGGGCGGATGAGCACCGACCGCGGGCGACCGGACCACTACCTGCTCGTCCG 1620
ACGGCGAGAACATCGACCGGACGCTGGGCTCGTCGATCTCGGCGGCGGCGGACTCCCGAGCAGCGCCCGGCTGGGAGCGGGTCTGG 1710
GTTTCGCGCAGCAGGCGTGGGGGAGCGGTCAAGGCGCTGTTCTTCTCAACGCGTCAACGGGTCCCTGCCGATGTCGTCGTCGAGG 1800
CGCTGCTCGGATCGGGTTCACGCCCATCCCCCTGTGCGGGGAGTCTGACGAGAAGGTCTGTCGACCTGCAG 1871

Figure 3.14: Séquence génétique du gène de fusion *csn-pt-cbd*_{Cex} et séquence d'acides aminés déduite. La composition en a.a. est la suivante: 1-40 peptide signal et 41-276 module catalytique CSN de *Streptomyces* sp. N174; 277-387 a.a. codé par une portion du plasmide pIJ680-PT-CBD_{Cex} comprenant le peptide signal de l'exoglucanase CEX; 288-308 espaceur riche en proline et thréonine et 309-415 domaine d'attachement CBD_{Cex} de *C. fimi*. Le site de clivage du peptide signal est indiqué par une flèche simple. Le domaine d'attachement à la cellulose est souligné. La région jouant le rôle d'espaceur entre les modules CSN et CBD_{Cex} est soulignée d'une ligne double.

3.1.4 Construction du plasmide pBP203, porteur du gène de fusion *csn-neg-cbd*_{Cex}

Ce plasmide porte le gène de fusion *csn-neg-cbd*_{Cex}. Les procédures utilisées pour sa construction sont représentées par la figure 3.15.

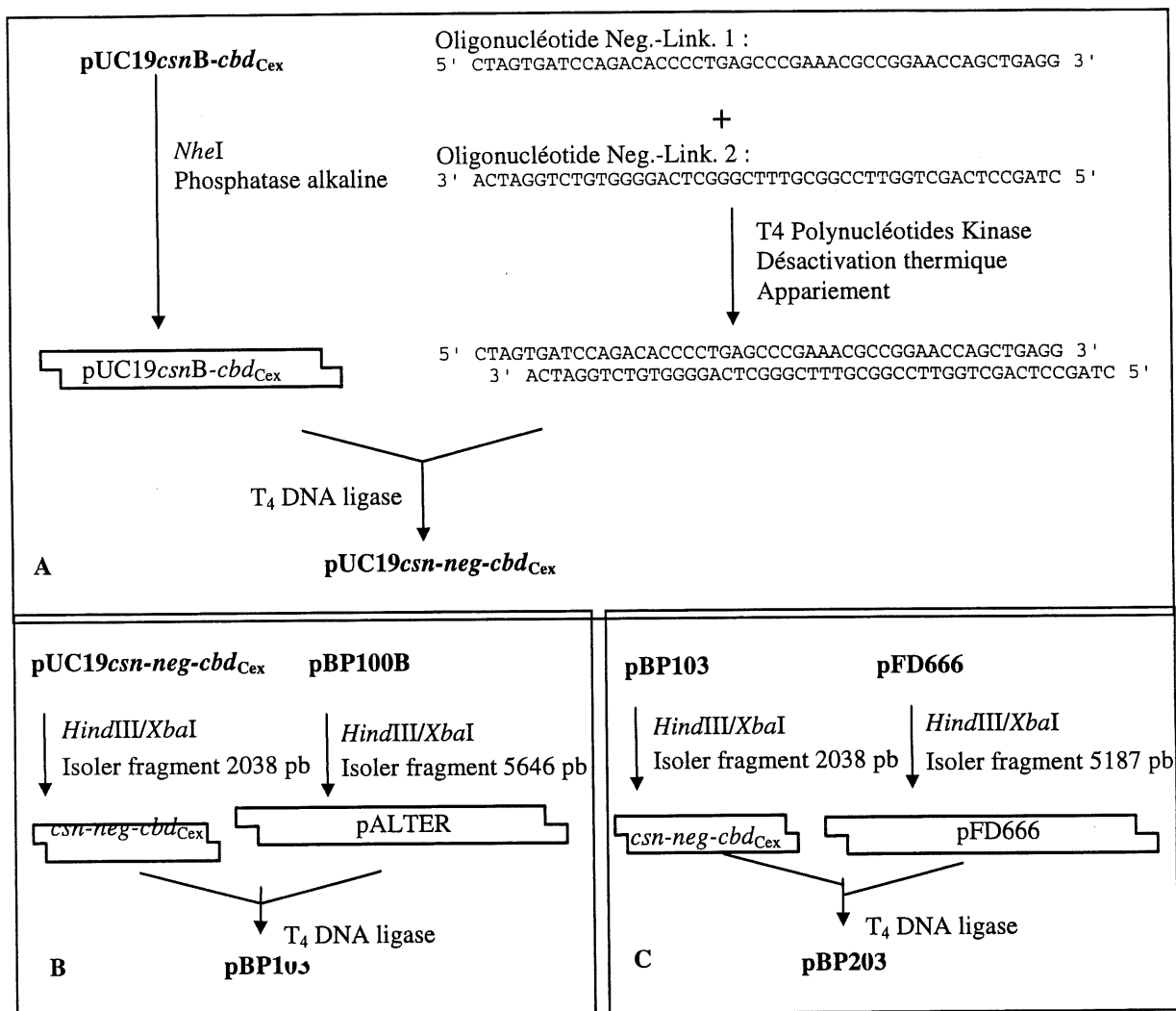


Figure 3.15: Étapes de construction du plasmide pBP203, porteur du gène de fusion *csn-neg-cbd*_{Cex}. A) Construction du plasmide intermédiaire pUC*csnB-neg-cbd*_{Cex}. B) Transfert du gène de fusion dans pALTER pour faciliter son séquençage. C) Transfert du gène de fusion dans pFD666 pour permettre son expression dans *S. lividans* TK24. Les plasmides sous leur forme circulaire sont identifiés en caractères gras. Les boîtes rectangulaires représentent les fragments linéaires d'ADN obtenus par traitements enzymatiques des plasmides circulaires.

3.1.4.1 Construction du plasmide pUC19 csn -neg-cbd_{Cex}

Le plasmide pUC19 csn B-cbd_{Cex} a d'abord été linéarisé par digestion *Nhe*I. Ensuite, les extrémités cohésives générées ont été déphosphorylées par l'action de la phosphatase alcaline d'intestin de veau (C.I.A.P.) pour éviter que le plasmide puisse se refermer sur lui même lors de la ligation, toutes traces d'enzymes ont été éliminées par électrophorèse sur gel d'agarose suivi d'une extraction par la méthode GENE CLEAN du plasmide linéarisé/déphosphorylé.

Parallèlement les oligonucléotides Neg.Link. 1 et Neg.Link 2 ont été phosphorylés par la T4 polynucléotides kinase. L'enzyme a été inactivée à la chaleur puis les oligonucléotides ont été appariés (procédure décrite à la section 2.1.8).

Ces ADNs ont été mélangés puis ligués par la T4 DNA ligase. Quatre ratios d'inserts / plasmides ont été ligués puis transformés. Pour minimiser les chances d'obtenir une double insertion, des colonies obtenues avec le plus faible rapport d'inserts / plasmides ont été choisies au hasard et leurs ADNs plasmidiques ont été extraits et analysés par digestions enzymatiques. Un clone candidat porteur d'un seul insert, correctement orienté, a été obtenu et nommé pUC19 csn -neg-cbd_{Cex}. La carte physique de ce plasmide est présentée en annexe 1.

3.1.4.2 Transfert du gène de fusion csn -neg-cbd_{Cex} dans le plasmide pALTER

Pour s'assurer qu'un seul insert ait été introduit, le gène de fusion a été transféré dans le plasmide pALTER puis séquencé partiellement dans la région correspondante au site d'insertion (i.e.: la fin du module csn , le module neg en entier et le début du module cbd_{Cex}).

Les plasmides pUC19 csn -neg-cbd_{Cex} et pBP100B ont été digérés par les enzymes de restriction *Hind*III et *Xba*I. Les produits de ces digestions ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments de 2038 pb et de 5646 pb respectivement porteurs du gène de

fusion et du vecteur pALTER linéarisé ont été purifiés par la méthode GENE CLEAN puis ligués entre eux. Les produits de ligation ont été transformés dans *E. coli* DH5 α F'. Des transformants ont été choisis au hasard et leurs ADNs plasmidiques ont été extraits et digérés par différentes enzymes de restriction. Les fragments d'ADN ainsi générés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette analyse du patron de restriction permet de valider la construction génétique. Un clone candidat porteur d'un seul gène de fusion, correctement orienté, a été obtenu et nommé pBP103. La carte physique de ce plasmide est présentée en annexe 1.

3.1.4.3 Séquençage partiel de pBP103

À l'aide du plasmide pBP103, la région correspondante au site d'insertion a été séquencée pour s'assurer de la présence d'un seul insert, correctement orienté et ayant la séquence de nucléotides prévue (donc sans erreur de synthèse des oligonucléotides). L'ADN sb a été obtenu par co-infection d'une culture de *E. coli* DH5 α F'(pBP103) par le phage M13KO7. Les produits des réactions de séquençage ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Ce gel a été séché et exposé à une pellicule photographique.

3.1.4.4 Transfert du gène de fusion *csn-neg-cbd*_{Cex} dans le plasmide pFD666

Une fois séquencé, le gène de fusion *csn-neg-cbd*_{Cex} a été transféré dans le plasmide pFD666 pour permettre son expression dans *Streptomyces lividans* TK24.

Les plasmides pBP103 et pFD666 ont été digérés par les enzymes de restriction *Hind*III et *Xba*I. Les produits de ces digestions ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments de 2038 pb et de 5646 pb respectivement porteurs du gène de fusion et du vecteur pALTER linéarisé ont été purifiés par la méthode GENE CLEAN puis ligués entre eux. Les produits de ligation ont été transformés dans *E. coli* DH5 α F'. Des transformants ont été choisis au hasard et leurs ADNs plasmidiques ont été extraits et digérés par différentes enzymes de restriction. Les fragments d'ADN ainsi générés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette analyse du patron de restriction permet de valider la construction génétique. Un clone candidat porteur d'un seul gène de fusion, correctement orienté, a été obtenu et nommé pBP203. La carte physique de ce plasmide est présentée à la figure 3.16. La séquence en acides nucléiques du gène de fusion et la séquence en acides aminés déduite de la protéine de fusion sont présentées à la figure 3.17.

GGATCCGTCGGGGGGGGGGCCCTCTGCGTGTCGGGCTCTCTGCGTGAGCCGGAGTCTGACGGTCCGTCACTTCGGTGGCGGATCGTT 90
GGCATGCGCGCGGTGAGGATTTGGGGCGGGCCCTTGGGAGGGCCGGAGGGGGCGCTTGAATCGGTAGGAAAGTTTCCTAACTCTC 180
TCTGCGGGCACCCCATGCCCAGCGACAGAAGACGGAGCGTCATATGCACCTCGCAGCACCGGACCGCACGCATCGCCCTGGCCGTCGTCC 270
M H S Q H R T A R I A L A V V 15
TCACCGCGATACCCGCATCGCTCGCCACCGCCGGAGTCGGCTACGCCTCCACTCAGGCGAGCACCGCCGTCAAGGCGGGTCCGGCCCTCG 360
L T A I P A S L A T A G V G Y A S T Q A S T A V K A G A G L 45
ACGATCCCCACAAGAAGGAGATCGCGATGGAGCTCGTCTCCAGCGCCGAGAACTCCTCCCTCGACTGGAAGGCCAGTACAAGTACATCG 450
D D P H K K E I E M A L V S S A E N S S L D W K A Q Y K Y I 75
AGGACATCGGTGACGGCCGCGGTACACCGCGCGCATCATCGGCTTCTGTTCGGGACCGCGGACATGCTGGAAGTCTCGTCCAGCACTACA 540
E D I G D G R G Y T G G I I G F C S G T G D M L E L V Q H Y 105
CCGACCTGGAGCCCGGCAACATCCTCGCCAAAGTACCTGCCGCGCTGAAGAAGGTCAACGGCTCGGCCCTCCCACTCCGGCTCGGCACCC 630
T D L E P G N I L A K Y L P A L K K V N G S A S H S G L G T 135
CGTTCCACCAAGGACTGGGCGACCGCCCGCAAGGACACCGTCTTCCAGCAGGCCAGAACGACGAGCGGACCGGGTCTACTTCGACCCGG 720
P F T K D W A T A A K D T V F Q Q A Q N D E R D R V Y F D P 165
CCGTGACGCGAGGCGAAGCCGCGCGCTGCGCGCGCTGGGCGAGTTCGCCCTACTACGACGCCATCGTGATGCACGGCCCCGGCAACGACC 810
A V S Q A K A D G L R A L G Q F A Y Y D A I V M H G P G N D 195
CGACCAAGTTCGGTGGCATCCGCAAGACCGCCATGAAGAAGCCAGGACCCCGCCCGGGCGGCGAGACCACTACCTCAACGCCT 900
P T S F G G I R K T A M K K A R T P A Q G G D E T T Y L N A 225
TCCTGGACGCCCGCAAGGCCCGCATGCTCACGAGGCCGCGCAGCAGACACCGCCGCTGGACACCGAGCAGCGGGTCTTCCTGAAGG 990
F L D A R K A A M L T E A A H D D T S R V D T E Q R V F L K 255
CCGGCAACCTCGACCTCAACCCCGCGCTGAAGTGAAGACCTACGGGGACCCGTACGTGATCAGGGATCCTCTAGCTAGTGATCCAGACA 1080
A G N L D L N P P L K W K T Y G D P Y V I R A P L A S D P D 285
CCCCTGAGCCCGAAACGCCGGAACAGCTGAGGCTAGCTCCGGTCCGGCCGGGTGCCAGGTGCTGTGGGGCGTCAACCAAGTGAACACCG 1170
T P E P E T P E P A E A S S G P A G C Q V L W G V N Q W N T 315
GCTTACCCGCAACGTCACCGTGAAGAACACGCTCCTCCGCTCCGGTCCGCGCGGTGACGCTCACGTTACGTTCCCGTCCGGCCAGCAGG 1260
G F T A N V T V K N T S S A P V D G W T L T F S F P S G Q Q 345
TCACCCAGGCGTGGAGCTGACGGTACGCGAGTCCGGCTCGGGCGTACGGTCCGCAACGCCCGGTGGAACGGCTCGATCCCGGCGGGCG 1350
V T Q A W S S T V T Q S G S A V T V R N A P W N G S I P A G 375
GCACCGCGCAGTTCGGCTTCAACGGCTCGCACACGGGCACCAACGCCCGCGCGACGGCGTTCCTCGCTCAACGGCACGCCCTGCACGGTCTG 1440
G T A Q F G F N G S H T G T N A A P T A F S L N G T P C T V 405
GCTGACGGGCGTGGTCTGTCGGTCCCGACGGGCCCGGGCACCGGGCGGTGGTGGCGCACGCCGCGGGTCAACGGGCCGGCGCGCTC 1530
G * 406
TGCGTCGATACGCTGGGCCGATGAGCACCGACCGGGCGACCGGACCACTACCTGCTGTCGACGGCGAGAACATCGACGGACGCTGG 1620
GCTCGTCGATTCCTCGGCGCGCGCGGACTCCCGAGCAGCGCCCGCGCTGGGAGCGGGTGTGGGTTCGCGCAGCAGGCGTGGGGGACG 1710
CGGTCAAGGCGCTGTTCTTCTCAACGCGTCAACGCGTCCCTGCCGATGTCGTTCTGTCAGGCGCTGCTCGGATCGGGTTCACGCCCA 1800
TCCCCCTGTGGGCGAGTCTGACGAGAAGGTCGTCGACCTGCAG 1844

Figure 3.17: Séquence génétique du gène de fusion *csn-neg-cbd*_{Cex} et séquence d'acides aminés déduite. La composition en a.a. est la suivante: 1-40 peptide signal et 41-276 module catalytique CSN de *Streptomyces sp.* N174; 277 a.a. codé par le codon muté lors de la création d'un site de restriction *Bcl*II (étape intermédiaire) 278-281 et 299, a.a. codés par une portion du SCM de pTZ18R; 282-298 a.a. codés la séquence synthétique des oligonucléotides Neg.Link; 300-406 domaine d'attachement CBD_{Cex} de *C. fimi*. Le site de clivage du peptide signal est indiqué par une flèche simple. Le domaine d'attachement à la cellulose est souligné. La région jouant le rôle d'espaceur entre les modules CSN et CBD_{Cex} est soulignée d'une ligne double.

3.1.5 Construction du plasmide pBP204, porteur du gène de fusion *csn-pos-cbd*_{Cex}

Ce plasmide porte le gène de fusion *csn-pos-cbd*_{Cex}. Les procédures utilisées pour sa construction sont représentées par la figure 3.18.

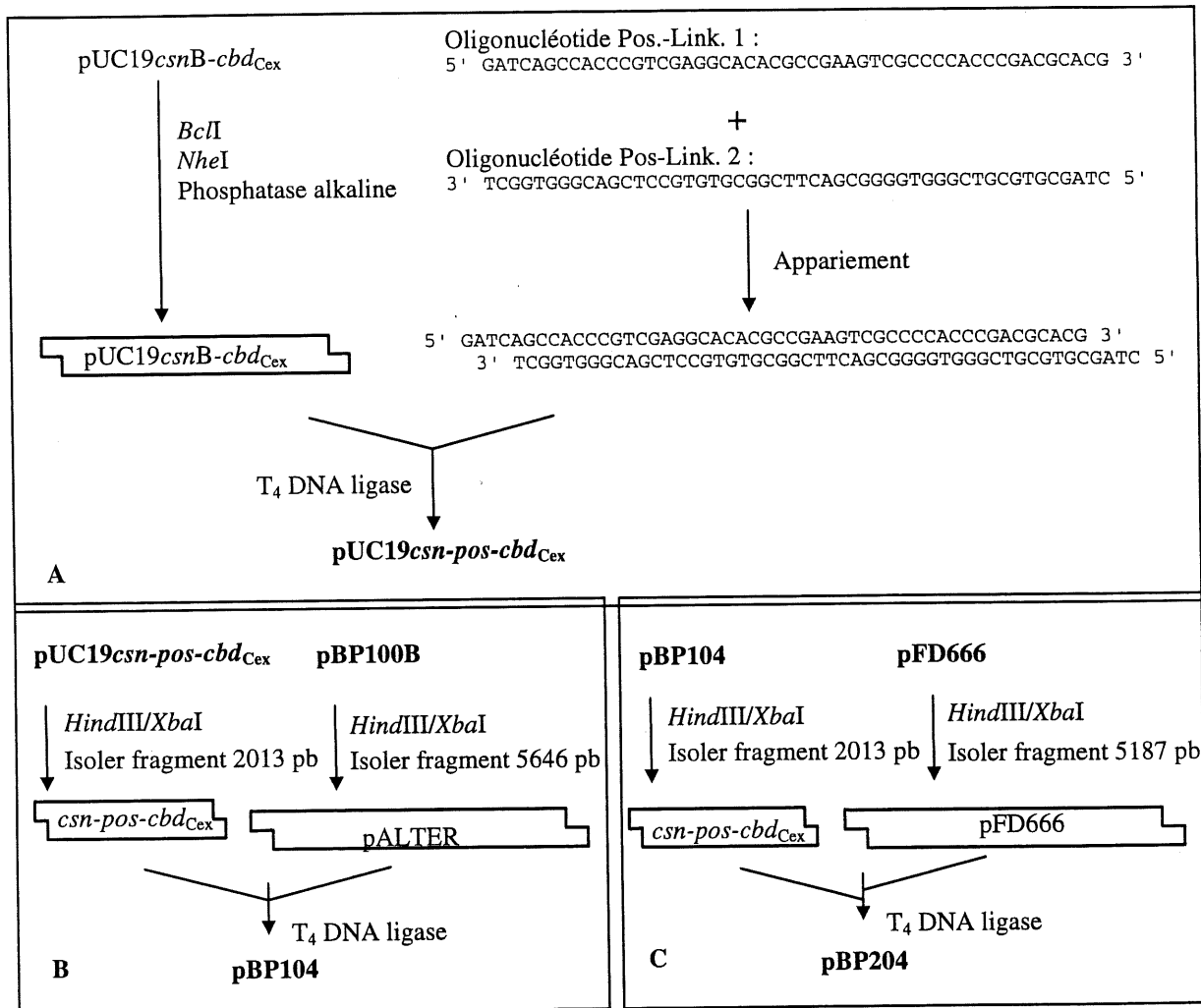


Figure 3.18: Étapes de construction du plasmide pBP203, porteur du gène de fusion *csn-pos-cbd*_{Cex}. A) Construction du plasmide intermédiaire pUC*csnB-neg-cbd*_{Cex}. B) Transfert du gène de fusion dans pALTER pour permettre son séquençage. C) Transfert du gène de fusion dans pFD666 pour permettre son expression dans *S. lividans* TK24. Les plasmides sous leur forme circulaire sont identifiés en caractères gras. Les boîtes rectangulaires représentent les fragments linéaires d'ADN obtenus par traitements enzymatiques des plasmides circulaires.

3.1.5.1 Construction du plasmide pUC19 csn - pos - cbd_{Cex}

Le plasmide pUC19 $csnB$ - cbd_{Cex} a été linéarisé par digestion *Bcl*I et *Nhe*I. Les produits de cette digestion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et le fragment de 4636 pb a été purifié du gel par la méthode GENE CLEAN.

Parallèlement les oligonucléotides Pos.Link. 1 et Pos.Link 2 ont été appariés.

Ces ADNs ont été mélangés puis ligués par la T4 DNA ligase. Les mélanges de ligation ont été transformés dans *E.coli* DH5 α F'. Des transformants ont été choisis au hasard et leurs ADNs plasmidiques ont été extraits et analysés par digestions enzymatiques. Un clone candidat porteur d'un seul insert, correctement orienté, a été obtenu et nommé pUC19 csn - pos - cbd_{Cex} . La carte physique de ce plasmide est présentée en annexe 1.

3.1.5.2 Transfert du gène de fusion csn - pos - cbd_{Cex} dans le plasmide pALTER

Le gène de fusion csn - pos - cbd_{Cex} a été transféré dans le plasmide pALTER pour permettre le séquençage de la région correspondante au site d'insertion (i.e.: la fin du module csn , le module pos en entier et le début du module cbd_{Cex}).

Pour obtenir ce transfert, les plasmides pUC19 csn - pos - cbd_{Cex} et pBP100B ont été digérés par les enzymes de restriction *Hind*III et *Xba*I. Les produits de ces digestions ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments de 2013 pb et de 5646 pb respectivement porteurs du gène de fusion et du vecteur pALTER linéarisé ont été purifiés par la méthode GENE CLEAN puis ligués entre eux. Les produits de ligation ont été transformés dans *E. coli* DH5 α F'. Des transformants ont été choisis au hasard et leurs ADNs plasmidiques ont été extraits et analysés par digestions enzymatiques. Un clone candidat porteur d'un seul gène de

fusion, bien orienté, a été obtenu et nommé pBP104. La carte physique de ce plasmide est présentée en annexe 1.

3.1.5.3 Séquençage partiel de pBP104

À l'aide du plasmide pBP104, la région correspondante au site d'insertion a été séquencée pour s'assurer de la présence d'un seul insert, correctement orienté et ayant la séquence de nucléotides prévue (donc sans erreur de synthèse des oligonucléotides). L'ADN *sb* a été obtenu par co-infection de *E. coli* DH5 α F'(pBP104) par le bactériophage M13KO7. Les produits des réactions de séquençage ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Ce gel a été séché et exposé à une pellicule photographique. L'autoradiographie ainsi obtenue est présentée à la figure 3.19.

3.1.5.4 Transfert du gène de fusion *csn-pos-cbd*_{Cex} dans le plasmide pFD666

Une fois séquencé, le gène de fusion *csn-pos-cbd*_{Cex} a été transféré dans le plasmide pFD666 pour permettre son expression dans *Streptomyces lividans* TK24.

Les plasmides pBP104 et pFD666 ont été digérés par les enzymes de restriction *Hind*III et *Xba*I. Les produits de ces digestions ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments de 2013 pb et de 5646 pb, respectivement porteurs du gène de fusion et du vecteur pALTER linéarisé, ont été purifiés par la méthode GENE CLEAN puis ligués entre eux. Les produits de ligation ont été transformés dans *E. coli* DH5 α F'. Des transformants ont été choisis au hasard et leurs ADNs plasmidiques ont été extraits et analysés par digestions enzymatiques. Un clone candidat porteur d'un seul gène de fusion, bien orienté, a été obtenu et nommé pBP204. La carte physique de ce plasmide est présentée à la figure 3.20. La séquence en

acides nucléiques du gène de fusion et la séquence en acides aminés déduite de la protéine de fusion sont présentées à la figure 3.21.

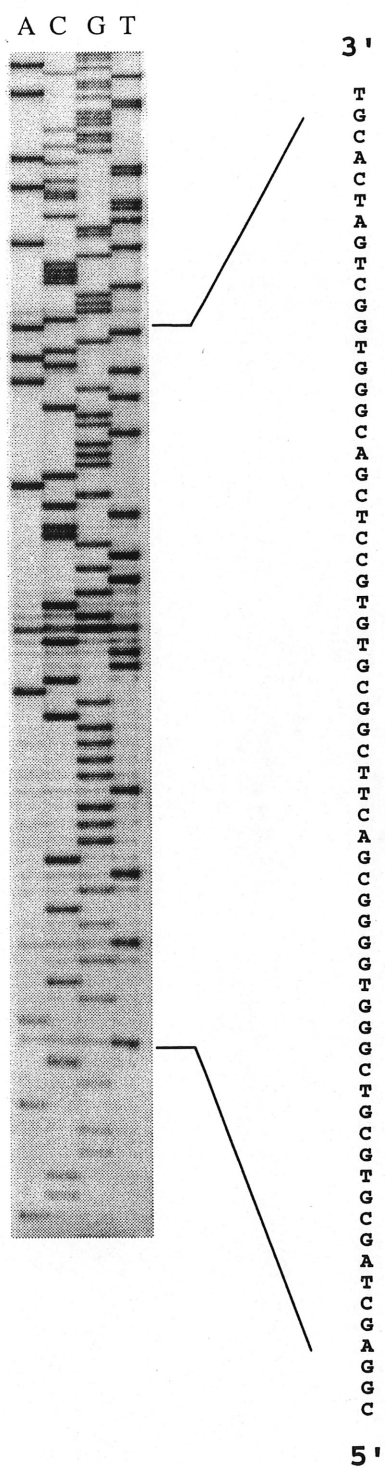


Figure 3.19: Autoradiographie du gel de séquençage partiel de pBP104.

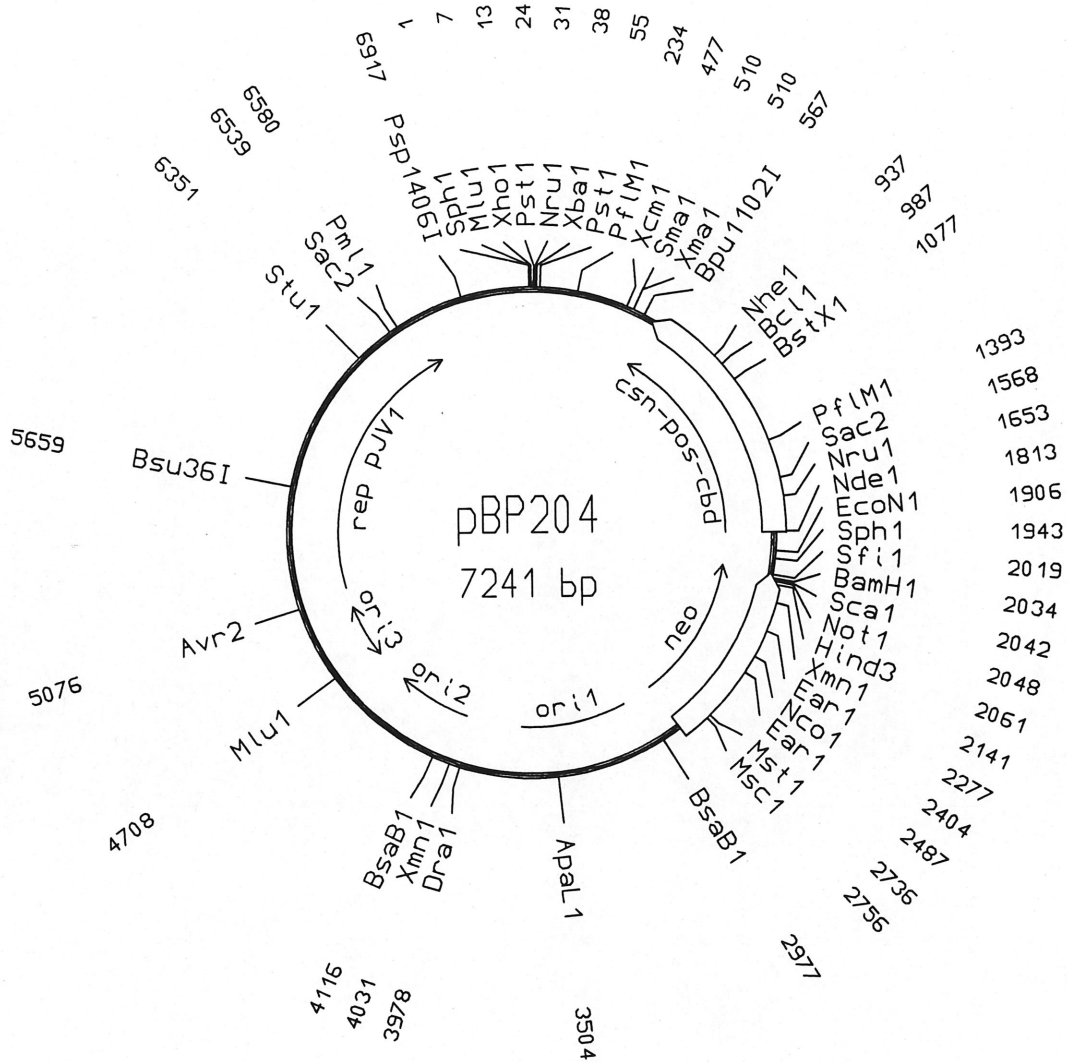


Figure 3.20: Carte physique du plasmide pBP204. Seuls les sites de restriction présents à deux positions ou moins sont représentés. ori1 = origine de réplication d'*E. coli* ; ori2 = origine de réplication du phage M13 ; ori3 = origine de réplication du plasmide pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes* ; neo : gène de résistance à la kanamycine (Denis et Brzezinski, 1992)

GGATCCGTCGCGGGCGGGGCCCCCTCTGCGTGTCCGGGCTCCTCTGCGTGAGCCGGAGTCTGACGGTCCGTCACCTTCGGTGGCGGATCGTT 90
 GGCATGCGCGCGGTTCAGGGATTGGGGCGGGGCCCTTGCAGAGGGCCGGAGGGGGCGCTTGAATCGGTTAGGAAAGTTTCCTAACTCTC 180
 TCTGCGGGCACCCCATGCCAGCGACAGAAGACGGAGCGTCATATGCACCTCGCAGCACCGGACCGCAGCATCGCCCTGGCCGTCGTCC 270
 M H S Q H R T A R I A L A V V 15
 TCACCGCGATACCCGATCGCTCGCCACCGCGGAGTCCGCTACGCTCCACTCAGGCGAGCACCGCGTCAAGGCCGGTCCCGGCTCG 360
 L T A I P A S L A T A G V G Y A S T Q A S T A V K A G A G L 45
 ACGATCCCCACAAGAAGGAGATCGCGATGGAGCTCGTCTCCAGCGCCGAGAACTCCTCCCTCGACTGGAAGGCCAGTACAAGTACATCG 450
 D D P H K K E I E M A L V S S A E N S S L D W K A Q Y K Y I 75
 AGGACATCGGTGACGGCCGCGGTACACCGCGCGCATCATCGGCTTCTGTTCGGGGACCGCGACATGCTGGAAGTCCGTCAGCACTACA 540
 E D I G D G R G Y T G G I I G F C S G T G D M L E L V Q H Y 105
 CCGACCTGGAGCCCGGCAACATCCTCGCCAAGTACCTGCCCGCGTGAAGAAGGTCAACGGCTCGGCCCTCCACTCCGGCCTCGGCACCC 630
 T D L E P G N I L A K Y L P A L K K V N G S A S H S G L G T 135
 CGTTTACCAAGGACTGGGCGACCGCCGCAAGGACACCGTCTTCCAGCAGGCGCCAGAACGACGAGCGGACCGGGTCTACTTCGACCCGG 720
 P F T K D W A T A A K D T V F Q Q A Q N D E R D R V Y F D P 165
 CCGTCAGCCAGGCGAAGGCCGACCGCCTCGCGCGCTGGGCGAGTTCGCTTACTACGACGCCATCGTGATGACGCGCCCGGCAACGACC 810
 A V S Q A K A D G L R A L G Q F A Y Y D A I V M H G P G N D 195
 CGACCACTTCGGTGGCATCCGCAAGACCGCCATGAAGAAGGCCAGGACCCCGCCGAGGGCGGACGAGACCACTACCTCAACGCCT 900
 P T S F G G I R K T A M K K A R T P A Q G G D E T T Y L N A 225
 TCCTGGACGCGCGCAAGGCCCGCATGCTCACCGAGCGCGCGCAGCAGACACCGCGGTGGACACCGAGCAGCGGGTCTTCTGTAAGG 990
 F L D A R K A A M L T E A A H D D T S R V D T E Q R V F L K 255
 CCGGCAACCTCGACCTCAACCCCGCGCTGAAGTGAAGACCTACGGGGACCCGTACGTGATCAGCCACCCGTCGAGGCACACGCGAAGT 1080
 A G N L D L N P P L K W K T Y G D P Y V I S H P S R H T P L 285
 CGCCCCACCGACGACGCTAGCTCCGGTCCGGCCGGGTGCGAGGTGCTGTGGGGCGTCAACAGTGAACACCGGCTTCAACCGGAACG 1170
S P H P T H A S S G P A G C Q V L W G V N Q W N T G F T A N 315
 TCACCGTGAAGAACAGTCTCTCCGCTCCGGTTCGAGCGCTGGACGCTCAGCTTCAGCTTCCCGTCCGGCCAGCAGGTCAACCGCGTGA 1260
 V T V K N T S S A P V D G W T L T F S F P S G Q Q V T Q A W 345
 GCTCGACGGTCAACGACGCTCCGGTCCGGCTGACGGTCCGCAACGCCCCGTGGAACGGCTCGATCCCGCGGGCGGACCGCGCAGTTTCG 1350
S S T V T Q S G S A V T V R N A P W N G S I P A G G T A Q F 375
 GCTTCAACGGCTCGCACACGGGCACCAACGCGCGCGGACGGCGTTCTCGCTCAACGGCAGCCCTGCACGGTTCGGTGAACGGCGCTCG 1440
G F N G S H T G T N A A P T A F S L N G T P C T V G * 401
 GTCGTGCGGTCCCGACGGGCGGGGACCGGGCGGGTGGTCCGCGACCGCGCGGTCAACGGCCCGGCGCGCTCTGCGTCGATACGCTG 1530
 GGCGGATGAGCACCGACGCGGGGACCGGACCACTACCTGCTCGTCGACGGCGAGAACATCGACGCGACGCTGGGCTCGTCGATCCTCG 1620
 GCGCGCGGGGACTCCCGAGCAGCGCCCGCTGGGAGCGGGTCTGGGTTTCGCGCAGCAGGCGTGGGGGACCGGCTCAAGGCGCTGT 1710
 TCTTCCTCAACGCGTCAACGGGTCCCTGCCGATGTCTGTCGTCAGGCGCTGCTCGGATCGGGTTCAGCCCATCCCTCTCGGGCG 1800
 AGTCGTACGAGAAGGTCTGTCGACCTGCAG 1829

Figure 3.21: Séquence génétique du gène de fusion *csn-pos-cbd_{cex}* et séquence d'acides aminés déduite. La composition en a.a. est la suivante: 1-40 peptide signal et 41-276 module catalytique CSN de *Streptomyces sp.* N174; 277-292 a.a. codés la séquence synthétique des oligonucléotides Pos.Link; 293, a.a. codé par une portion du SCM de pTZ18R; 294-401 domaine d'attachement CBD_{cex} de *C. fimi*. Le site de clivage du peptide signal est indiqué par une flèche simple. Le domaine d'attachement à la cellulose est souligné. La région jouant le rôle d'espaceur entre les modules CSN et CBD_{cex} est soulignée d'une ligne double.

3.2 Expression des gènes de fusion dans *S. lividans* TK24

3.2.1 Détection de l'expression des gènes de fusion sur milieu de culture solide chitosane-agar

Suite à la transformation des gènes de fusion dans *Streptomyces lividans* TK24, les souches recombinantes ont été cultivées sur milieu solide chitosane-agar. Après 48-72 heures d'incubation à 30 °C, une zone d'éclaircissement a été observée pour chacune des souches recombinantes. La souche *S. lividans* TK24 (pRL270) a été utilisée comme témoin positif. Cette souche porte le gène *csn* de type sauvage et sécrète de façon efficace l'enzyme CSN (Masson et al., 1993). La souche *S. lividans* TK24 (pFD666) a été utilisée comme témoin négatif. Ces résultats sont présentés à la figure 3.22. La présence d'une zone d'éclaircissement autour des colonies formées par les souches recombinantes est une première indication que les gènes de fusion sont exprimés et permettent la production d'enzymes capables d'hydrolyser le chitosane. Cette figure présente également l'expression des gènes de fusion *csn-cbd_{Cex}* et *csnB-cbd_{Cex}* par les souches *S. lividans* (pATS390) et *S. lividans* (pBP200B) respectivement. Les séquences en acides nucléiques de ces gènes de fusion ainsi que les séquences en acides aminés déduites pour les protéines de fusion sont présentées en annexe 2.

3.2.2 Production des enzymes de fusion en milieu de culture chitosane liquide

Les souches recombinantes ont ensuite été cultivées en milieu chitosane liquide. Tout au long des cultures, des échantillons de surnageant ont été prélevés à différents temps et la quantité de protéines totales de même que l'activité chitosanolytique de ces surnageants ont été déterminées.

La figure 3.23 montre l'évolution de ces deux paramètres pour les souches *S. lividans* TK24 (pBP201) et *S. lividans* TK24 (pBP251), cultivées en erlenmeyers de 4l. Ces résultats sont

représentatifs de ceux obtenus pour les cultures de l'ensemble des souches recombinantes. On peut voir que l'activité chitosanolytique et la quantité de protéines totales des surnageants évoluent de façon parallèle jusqu'à la chute de l'activité chitosanolytique. Cette même évolution en parallèle a été observée par Boucher pour l'enzyme CSN de type sauvage lorsque produite par *S. lividans* (pRL270)¹. Après la chute d'activité, on observe une augmentation de la quantité de protéines totales. Ces résultats nous permettent de penser que la chute d'activité coïncide avec une augmentation de la production des protéases extracellulaires endogènes, lesquelles dégradent les enzymes chitosanolytiques. Cette hypothèse concorde avec celle émise par Masson et al. (1993) pour expliquer la diminution de l'activité chitosanolytique des surnageants lors de l'expression du gène *csn* sauvage dans *S. lividans* TK24 (pRL270).

Dans la plupart des cultures exécutées en erlenmeyers de 4 l, l'activité maximale dans les surnageants a été atteinte après 100 heures (+/- 20 h) de culture. Lors d'un essai en bioréacteur automatisé, ce maximum a été atteint plus rapidement, soit autour de 55 h. Le suivi de l'activité chitosanolytique et de la concentration en protéines totales du surnageant obtenu lors de cette expérience est présenté à la figure 3.24. Comme le démontre ces résultats, les deux paramètres varient encore une fois de façon parallèle dans la première partie de la culture.

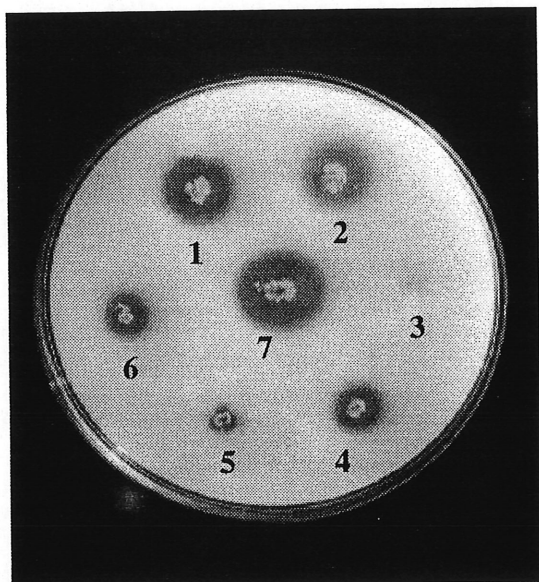
Les activités maximales et les concentrations maximales de protéines ont varié d'une culture à l'autre. Les activités chitosanolytiques observées varient de 0.9 à 3 U par ml. Toutefois peu de conclusions peuvent être tirées par comparaison des niveaux atteints avec les différents gènes de fusion puisque des variations du même ordre (3 U/ml versus 1.5 U/ml) ont été observées pour 2 cultures de la même souche recombinante, soit *S. lividans* (pBP251).

Les principales conclusions à tirer de ces suivis de cultures sont: 1- En début de culture, l'activité chitosanolytique et la concentration des protéines totales varient de façon parallèle pour les enzymes de fusion étudiées. 2- L'expression des gènes de fusion entraîne une

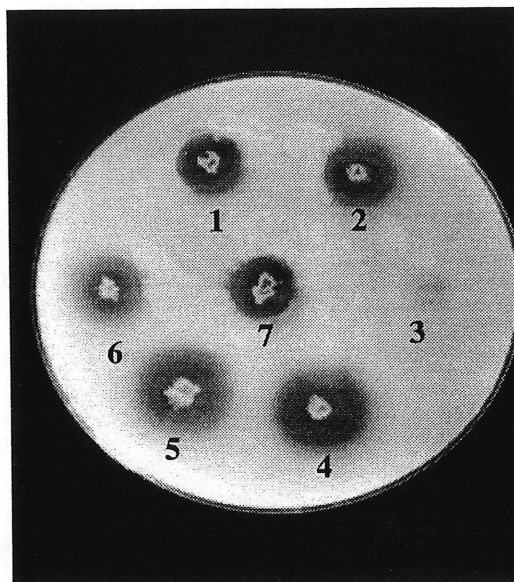
¹ Boucher, I. , communication personnelle orale, mai 1996.

augmentation de l'activités chitosanolytiques des surnageants qui est inférieure de 4 à 5 fois à celles obtenues par l'expression du gène *csn* de type sauvage².

² Brzezinski, R., communication personnelle orale, juin 1997.



- 1- *S. lividans* TK24 (pBP202)
- 2- *S. lividans* TK24 (pBP201)
- 3- *S. lividans* TK24 (pFD666)
- 4- *S. lividans* TK24 (pBP251)
- 5- *S. lividans* TK24 (pBP204)
- 6- *S. lividans* TK24 (pBP203)
- 7- *S. lividans* TK24 (pRL270)



- 1- *S. lividans* TK24 (pBP204)
- 2- *S. lividans* TK24 (pBP251)
- 3- *S. lividans* TK24 (pFD666)
- 4- *S. lividans* TK24 (pBP201)
- 5- *S. lividans* TK24 (pBP202)
- 6- *S. lividans* TK24 (pATS390)
- 7- *S. lividans* TK24 (pBP200B)

Figure 3.22: Détection de l'activité chitosanolytique des souches recombinantes sur milieux de culture solide agar-chitosane. La souche *S. lividans* TK24 (pRL270) porte le gène *csn* de type sauvage et joue donc le rôle de témoin positif. La souche *S. lividans* (pFD666) porte le vecteur d'expression sans insert et joue le rôle de témoin négatif. Le milieu de culture est initialement opaque dû à la présence de chitosane précipité. Les photographies ont été prises sur fond noir.

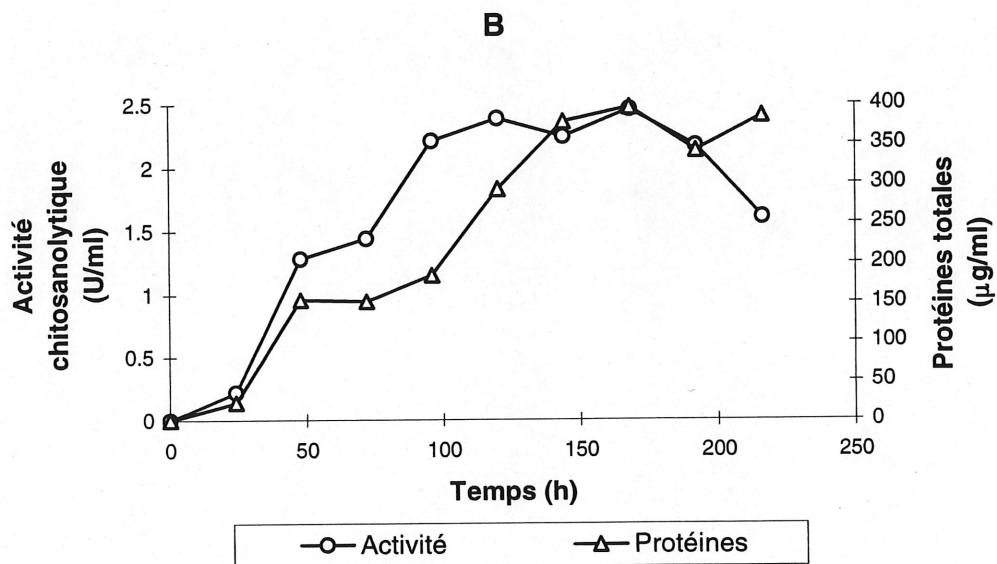
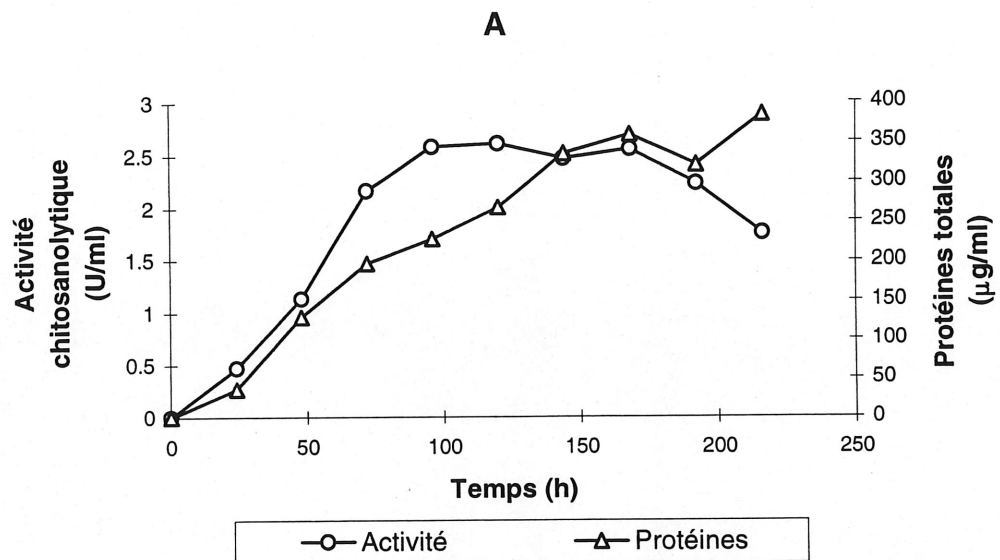


Figure 3.23: Suivis des cultures de A) *S. lividans* TK24 (pBP201) et B) *S. lividans* TK24 (pBP251) cultivées en erlenmeyers de 4 l. Cultures de 0.5 l en erlenmeyers de 4 l, à 30 °C avec agitation de 300 rpm.

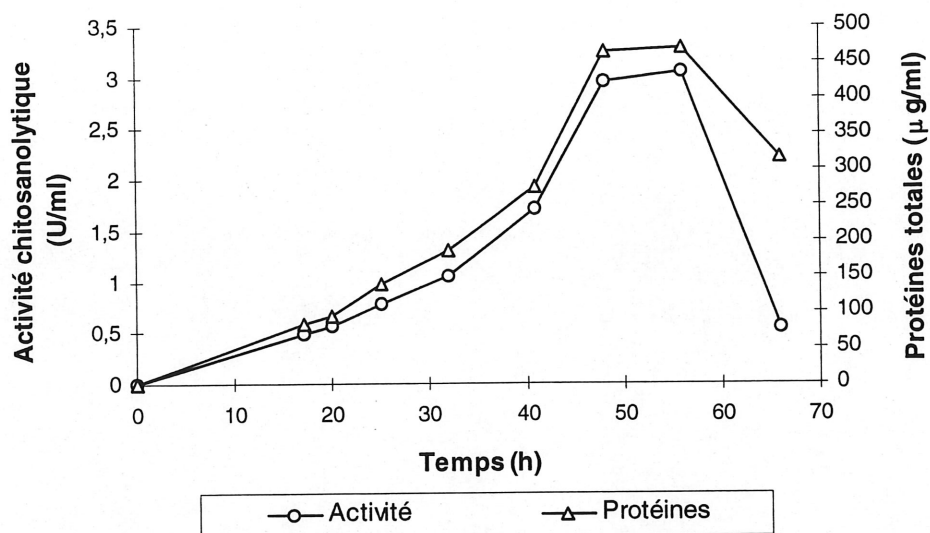


Figure 3.24: Suivi de la culture de *S. lividans* TK24 (pBP202) en bioréacteur automatisé. Culture batch de 1.2 l dans un bioréacteur automatisé BIOFLO III, de New Brunswick Scientific. Agitation de 350 rpm et aération de 4 l d'air / min.

3.2.3 Électrophorèse des protéines totales sur gel de polyacrylamide-SDS dénaturant

Les poids attendus des enzymes de fusions ont pu être calculés en faisant l'approximation du poids molaire des a.a. à 110 g/mol. Les poids ainsi calculés sont présentés dans le tableau 3.1. Pour vérifier la présence des protéines de fusion dans les surnageants, des échantillons de protéines totales ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS dénaturant et colorées au bleu de commassie. Les figures 3.25 à 3.27 présentent les résultats obtenus par ce type d'analyse.

Tableau 3.1: Poids calculé des protéines de fusion matures.

Protéine	Nb. d'a.a. (*)	Poids calculé (kDa)
CSN-CBD _{Cex}	350	38.5
CSN-G-XBD	357	39.3
CSN-G-CBD _{Cex}	377	41.5
CSN-PT-CBD _{Cex}	375	41.3
CSN-NEG-CBD _{Cex}	366	40.3
CSN-POS-CBD _{Cex}	361	39.7

(*) Ces données correspondent au nombre d'acides aminés des protéines matures, donc après clivage de leur peptide signal de 40 a.a.

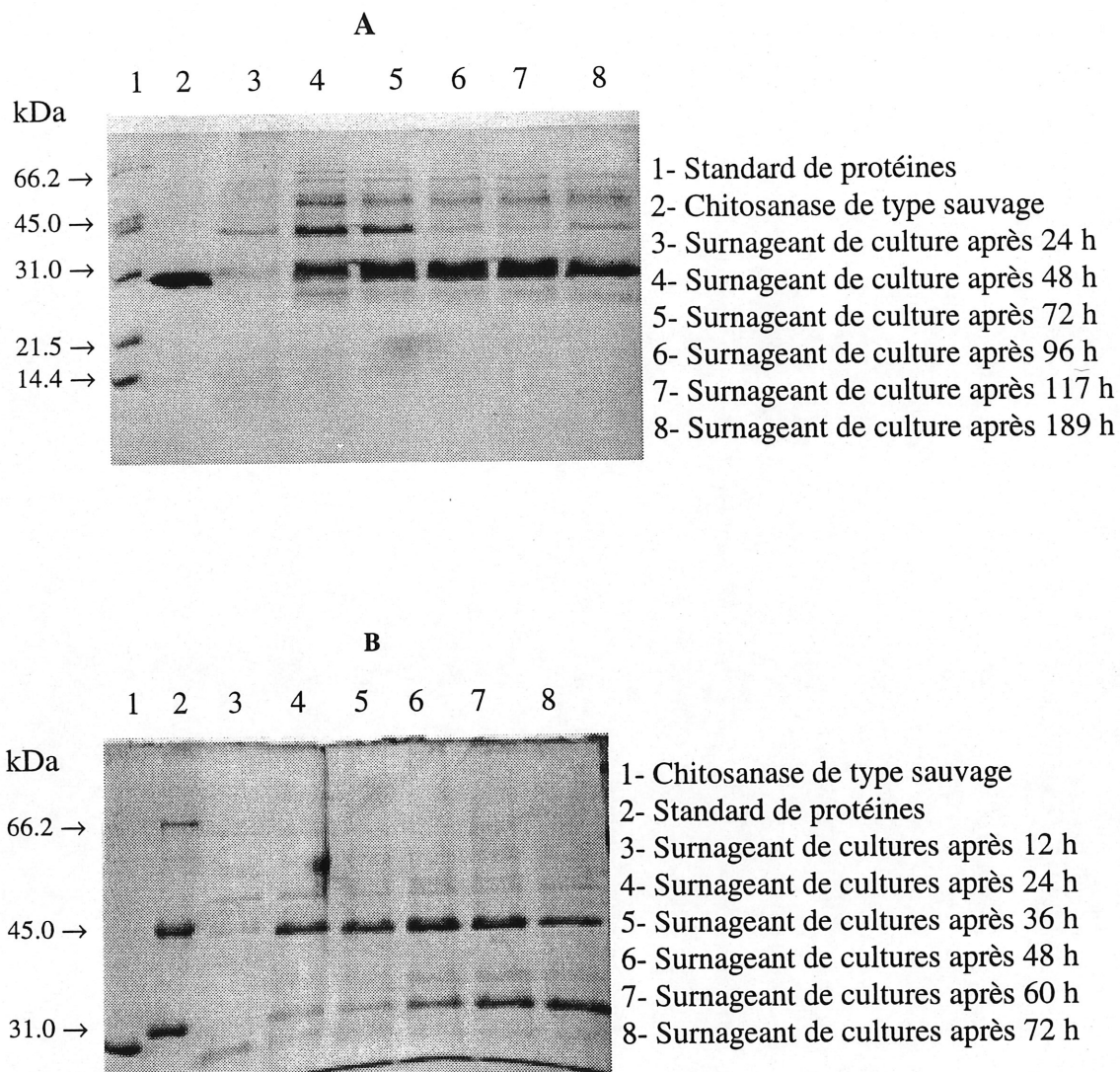


Figure 3.25: Électrophorèse, sur gel de polyacrylamide-SDS dénaturant, des protéines totales contenues dans les surnageants de culture de A) *S. lividans* TK24 (pATS390) et B) *S. lividans* TK24 (pBP251). La quantité de protéines totales par puits est de A) 7µg et B) 5 µg.

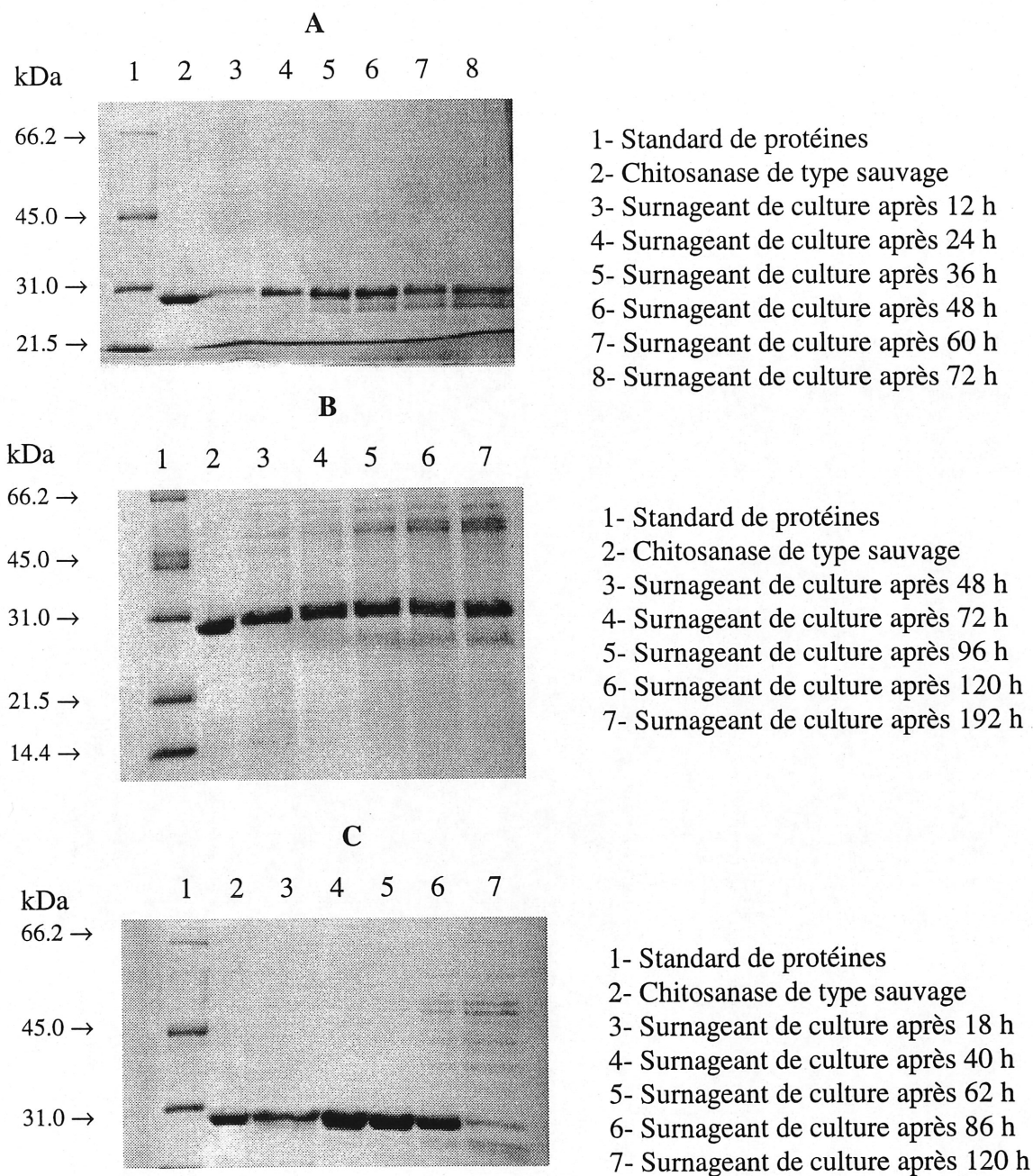


Figure 3.26: Électrophorèse, sur gel de polyacrylamide-SDS dénaturant, des protéines totales contenues dans les surnageants des cultures de A) *S. lividans* TK24 (pBP201), B) *S. lividans* TK24 (pBP202) et C) *S. lividans* TK24 (pBP204). La quantité de protéines totales par puits est de 5 µg.

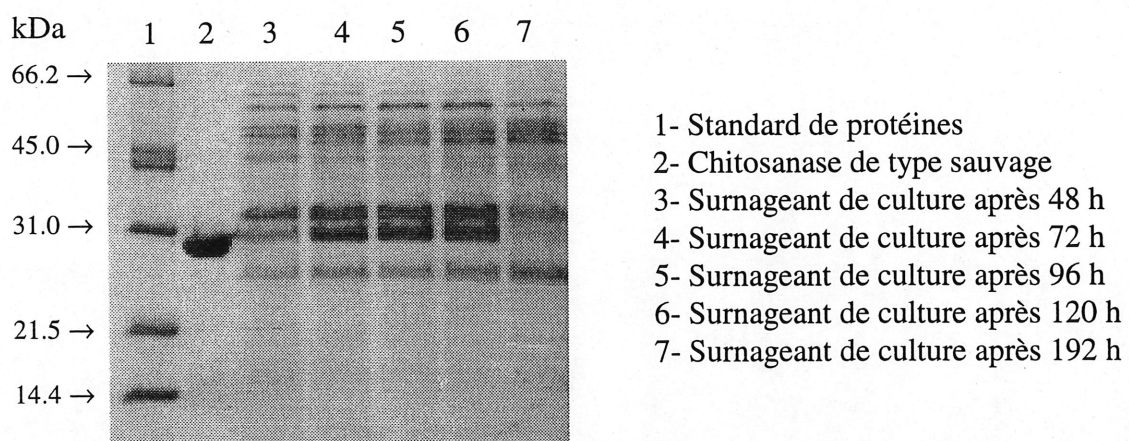


Figure 3.27: Électrophorèse, sur gel de polyacrylamide-SDS dénaturant, des protéines totales contenues dans le surnageant de la culture de *S. lividans* TK24 (pBP203). La quantité de protéines totales par puits est de 7 μ g.

Une première observation qui ressort de l'ensemble des analyses par électrophorèse des protéines totales des surnageants est la présence d'une bande importante migrant aux environs de 30 kDa de même que la présence de bandes de plus faible intensité migrant aux environs de 40 kDa, soit le poids attendu des protéines de fusion.

Les résultats ont été regroupés en trois figures sur lesquelles les analyses ayant des traits communs ont été regroupées.

D'abord la figure 3.25 présente l'analyse des surnageants qui contiennent les plus grandes proportions de protéines migrant aux environs de 40 kDa. En A, l'analyse des protéines produites par *S. lividans* (pATS390) montre qu'après 24 h de culture, la proportion de protéines migrant aux alentours de 30 et 40 kDa est d'environ 1:1. Par la suite, avec le temps de culture qui augmente, cette proportion augmente également. Sané (1995) a obtenu des résultats comparables avec cette même souche. De plus, il a clairement identifié la présence du module catalytique dans les bandes de 30 et 40 kDa par immunodétection. Ceci suppose donc que la protéine de 40 kDa serait la protéine de fusion CSN-CBD_{Cex} et que celle de 30 kDa serait un produit de dégradation contenant le module CSN. Rappelons que les modules CSN et CBD_{Cex} ont un poids moléculaire attendu de 26.6 et 11.9 kDa respectivement. Sané (1995) a également proposé que la protéine de fusion serait clivée dans la région amorphe qui sépare les domaines CSN et CBD_{Cex}. Les bandes qui migrent aux dessus de 45 kDa ne réagissent pas avec l'anticorps dirigé contre la chitosanase. Il s'agit probablement de protéines extracellulaires produites de façon endogène par *S. lividans*.

En B, l'analyse des protéines produites par la souche *S. lividans* (pBP251) montre une forte présence de protéines migrant aux environs de 45 kDa. Même si une analyse par immunodétection n'a pas été réalisée pour vérifier la nature de cette protéine, nous pouvons penser qu'il s'agit de la protéine de fusion CSN-G-XBD. Comme pour CSN-CBD_{Cex}, l'intensité de la bande à 45 kDa diminue avec le temps alors que celle de 30 kDa augmente. Cette bande d'environ 30 kDa pourrait être un produit de dégradation équivalent à celui observé pour

l'enzyme CSN-CBD_{Cex}. D'autres bandes mineures peuvent être observées incluant les bandes typiques migrant aux dessus de 45 kDa.

La figure 3.26 présente l'analyse des protéines extracellulaires produites par trois souches pour lesquelles pratiquement aucune bande à 40 kDa n'est observée. Une bande principale est toujours présente à 30 kDa, et correspond probablement aux produits de dégradation des enzymes CSN-G-CBD_{Cex} (A), CSN-PT-CBD_{Cex} (B) et CSN-POS-CBD_{Cex} (C).

Finalement la figure 3.27 montre l'analyse des protéines extracellulaires produites *S. lividans* (pBP203). Cette analyse montre la présence d'une très faible proportion de protéines migrant aux environs de 40 kDa alors que la culture est âgée de 48 et 72h. La particularité de cette culture est sa production des protéines d'environ 27, 30 et 32 kDa. Il s'agit probablement de trois produits de dégradation de la protéine de fusion CSN-NEG-CBD_{Cex}. Des protéines migrant au dessus de 45 kDa sont encore observables.

3.3 Étude des enzymes de fusion en bioréacteur

3.3.1 Évaluation du volume mort des colonnes

Le volume mort des colonnes correspond au volume non occupé par la phase solide. C'est le volume que la solution de substrat occupe à l'intérieur du bioréacteur. Ce volume a été estimé pour le type de bioréacteur utilisé dans cette étude, c'est à dire un réacteur colonne, tel que décrit à la section 2.3.2, et contenant 3.5 g de particules de cellulose de 50 microns (Avicel pH101). Suite à une injection instantanée de D-glucosamine à titre de traceur, le temps de résidence a été évalué en mesurant la concentration de glucosamine (par dosage des sucres réducteurs) à la sortie du bioréacteur. Le débit appliqué était de 15 ml/h. Les résultats de cette analyse sont présentés à la figure 3.28.

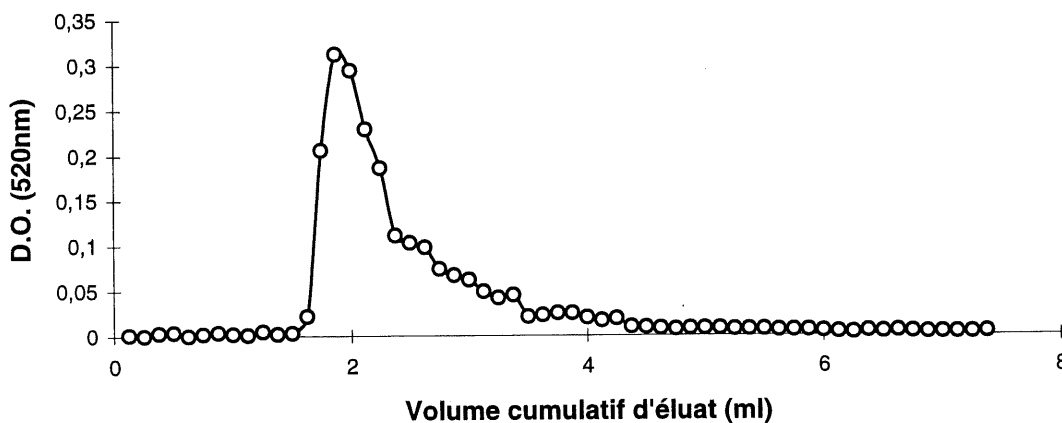


Figure 3.28 Détermination du volume mort des colonnes. La D.O. est directement proportionnelle à la concentration de sucres réducteurs.

Ces résultats démontrent que le flux à l'intérieur du bioréacteur n'est pas idéal. Les causes les plus fréquentes de déviation du flux par rapport à un flux idéal sont les phénomènes de

dispersion et de chemin préférentiels (Tchobanoglous, 1987; Coutouly, 1991). Néanmoins, un volume mort d'environ 2 ml peut être estimé à partir de ces résultats.

L'intérêt de ce résultat est qu'il permet de mesurer le temps de résidence du substrat (θ_H). Ce dernier est relié au débit (Q) et au volume (V) d'un bioréacteur par la relation :

$$\theta_H = V / Q$$

Le volume mort estimé de 2 ml à un débit de 15 ml/h correspond donc à un temps de résidence moyen de 8 min. Ce volume mort de 2 ml représente 20% du volume total de 10 ml occupé par la phase solide et le substrat.

Ce temps de résidence moyen de 8 min. correspond au temps de réaction à l'intérieur du bioréacteur. Cette nouvelle donnée permet de calculer l'activité enzymatique des colonnes. Toutefois, puisque les enzymes sont liées à un support, celles-ci n'occupent pas tout le volume accessible au substrat. On ne peut donc comparer les conditions de réaction enzymatique à l'intérieur d'un bioréacteur à celles utilisées pour déterminer l'activité enzymatique en solution (tel que décrit à la section 2.2.7). On parle alors "d'unité d'activité enzymatique immobilisée", et ces unités ne sont comparables que pour des bioréacteurs de configurations identiques (volume total, particules de cellulose, etc.)

3.3.2 Étude du niveau d'hydrolyse en fonction du débit du substrat

Le degré d'hydrolyse du chitosane par une chitosanase dans un bioréacteur de type piston est déterminé par le débit d'alimentation du substrat. Cette prémisses a été vérifiée en évaluant le degré d'hydrolyse du substrat après passage dans les bioréacteurs à différents débits. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.29 pour les enzymes CSN-PT-CBD_{Cex} et CSN-G-XBD. Des résultats similaires ont été obtenus avec les enzymes CSN-G-CBD_{Cex} et CSN-

CBD_{Cex} . Ce type d'expérience n'a pas été fait avec les enzymes CSN-NEG- CBD_{Cex} et CSN-POS- CBD_{Cex} .

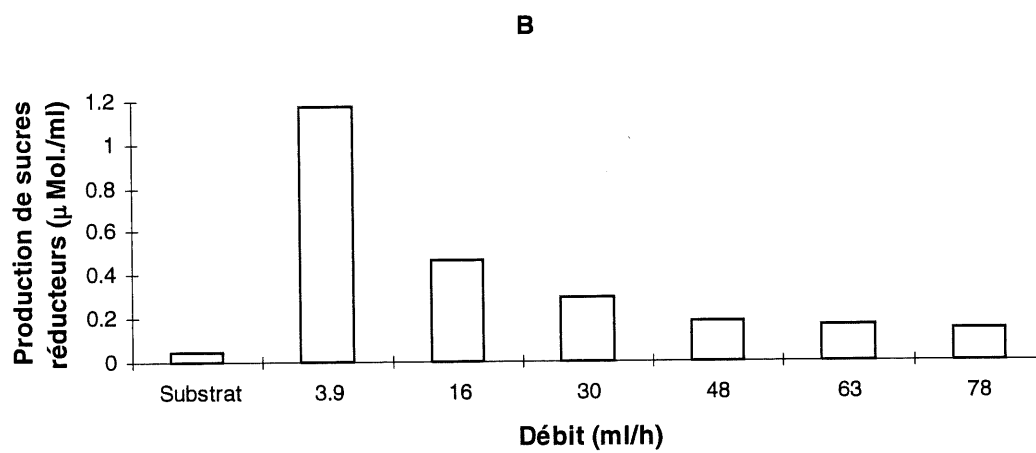
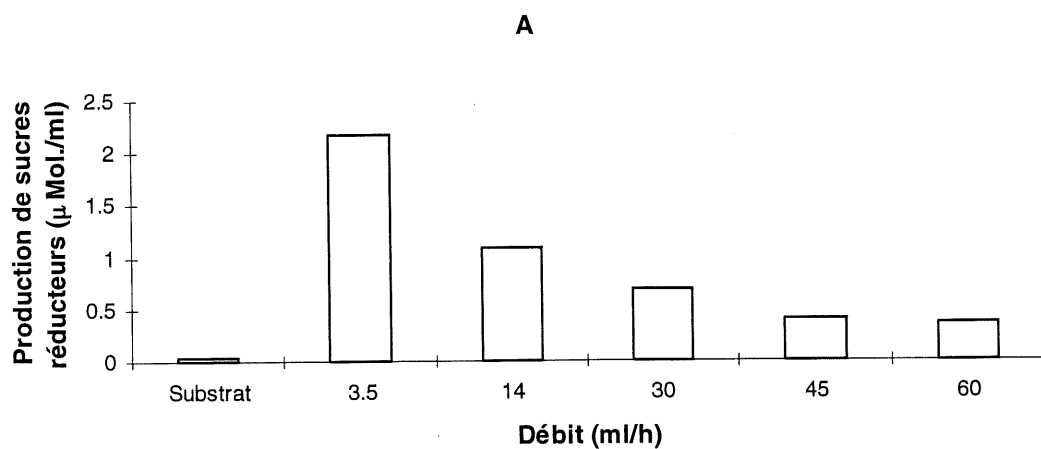


Figure 3.29: Variation du degré d'hydrolyse en fonction du débit appliqué pour les enzymes A) CSN-PT-CBD_{Cex} et B) CSN-G-XBD. Substrat : échantillon de substrat non digéré, indique la concentration de sucres réducteurs avant l'hydrolyse en bioréacteur.

3.3.3 Stabilité des enzymes en bioréacteur.

La stabilité des enzymes de fusion a été étudiée en mesurant la quantité de sucres réducteurs produits par les bioréacteurs enzymatiques utilisés plusieurs jours à température et débit constants. Une première série d'expériences a été conduite à la température de 37°C. La figure 3.30 montre les résultats obtenus dans cette condition avec les enzymes CSN-PT-CBD_{Cex} et CSN-G-XBD.

Des résultats similaires ont été obtenus avec l'enzymes CSN-CBD_{Cex}. La diminution de la production de sucres réducteurs par les enzymes immobilisées semble suivre une cinétique exponentielle. Cette particularité est souvent observée pour les enzymes immobilisés et dans ce cas, le tracé de l'activité résiduelle sur échelle logarithmique en fonction du temps donne une droite (Prenosil et al., 1987). La figure 3.31 reprend les données de la figure 3.30 sous cette forme semi-logarithmique.

Notons également que, pour chacune de ces expériences, des échantillons de produits ont été prélevés et incubés à 37 °C pour une période de 24 h. Aucune augmentation significative de la concentration de sucres réducteurs n'a alors été observée. Ce résultat suggère que les enzymes actives ne fuient pas du bioréacteur.

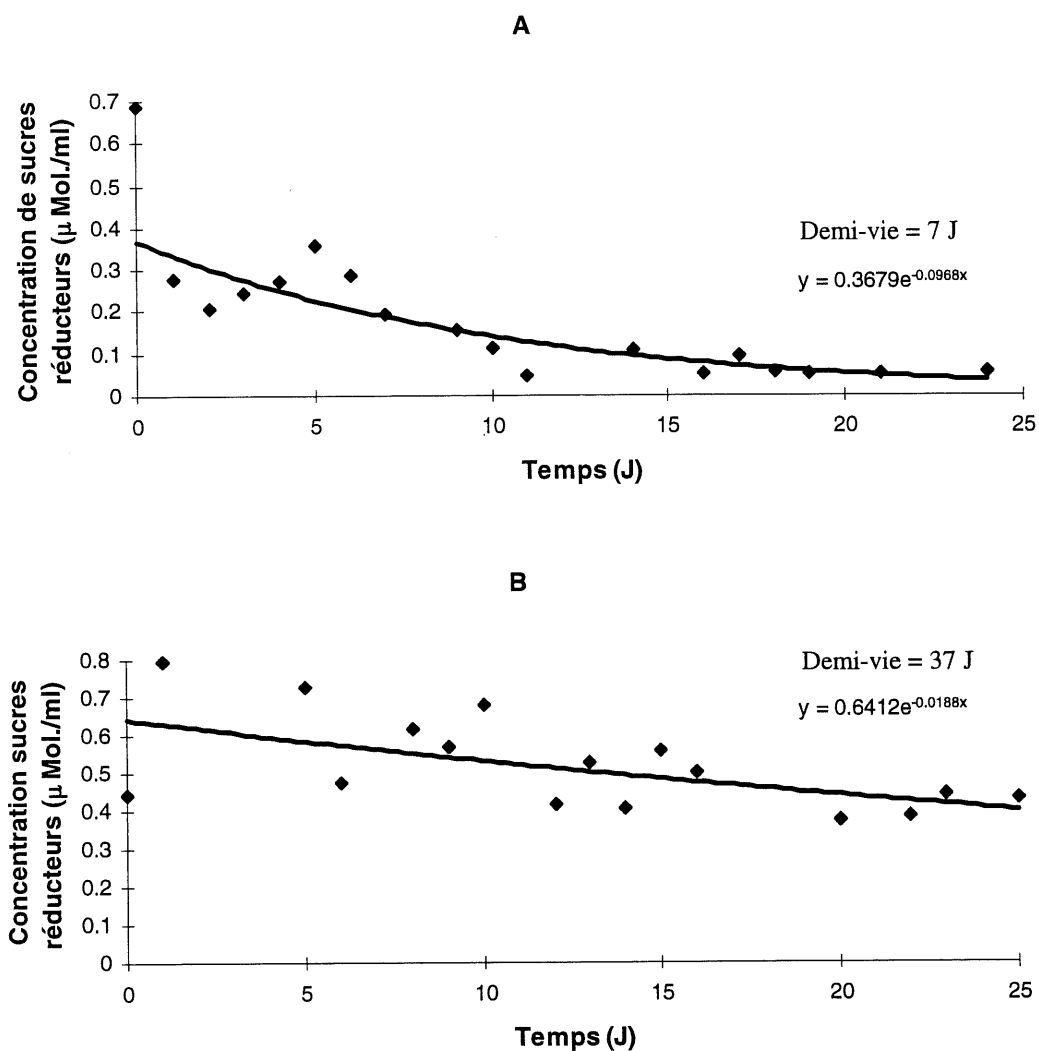


Figure 3.30 Estimation de la stabilité enzymatique : représentation exponentielle pour les enzymes A) CSN-PT-CBD_{Cex} et B) CSN-G-XBD à 37°C. Les débits appliqués étaient de A) 14 ml/h et B) 4 ml/h. Les courbes exponentielles ainsi que leurs équations, représentent de manière satisfaisante les points expérimentaux. Les demi-vies calculées sont aussi indiquées.

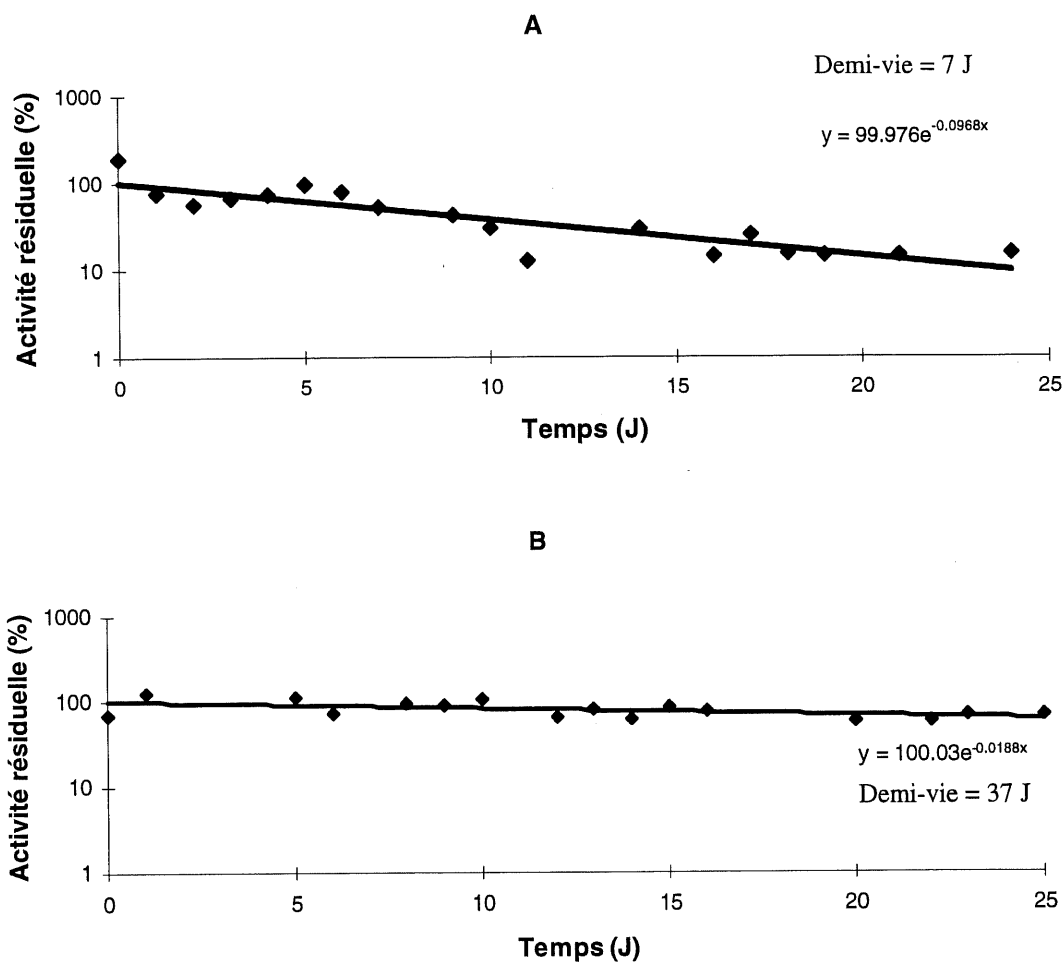


Figure 3.31: Estimation de la stabilité enzymatique : représentation semi-logarithmique pour les enzymes A) CSN-PT-CBD_{Cex} et B) CSN-G-XBD à 37°C. Les débits appliqués étaient de A) 14 ml/h et B) 4 ml/h. Les courbes exponentielles ainsi que leurs équations représentent de manière satisfaisante les points expérimentaux. Les demi-vies calculées sont aussi indiquées.

Des essais à 45°C et 55°C ont également été réalisés. La figure 3.32 montre les résultats obtenus avec l'enzyme CSN-PT-CBD_{Cex} à 45°C.

Des résultats similaires ont été obtenus avec l'enzyme CSN-G-XBD (résultats non montrés). Par contre, dans des conditions identiques, l'enzyme CSN-NEG-CBD_{Cex} a démontré une très faible stabilité, perdant toute son activité après une vingtaine d'heures d'utilisation.

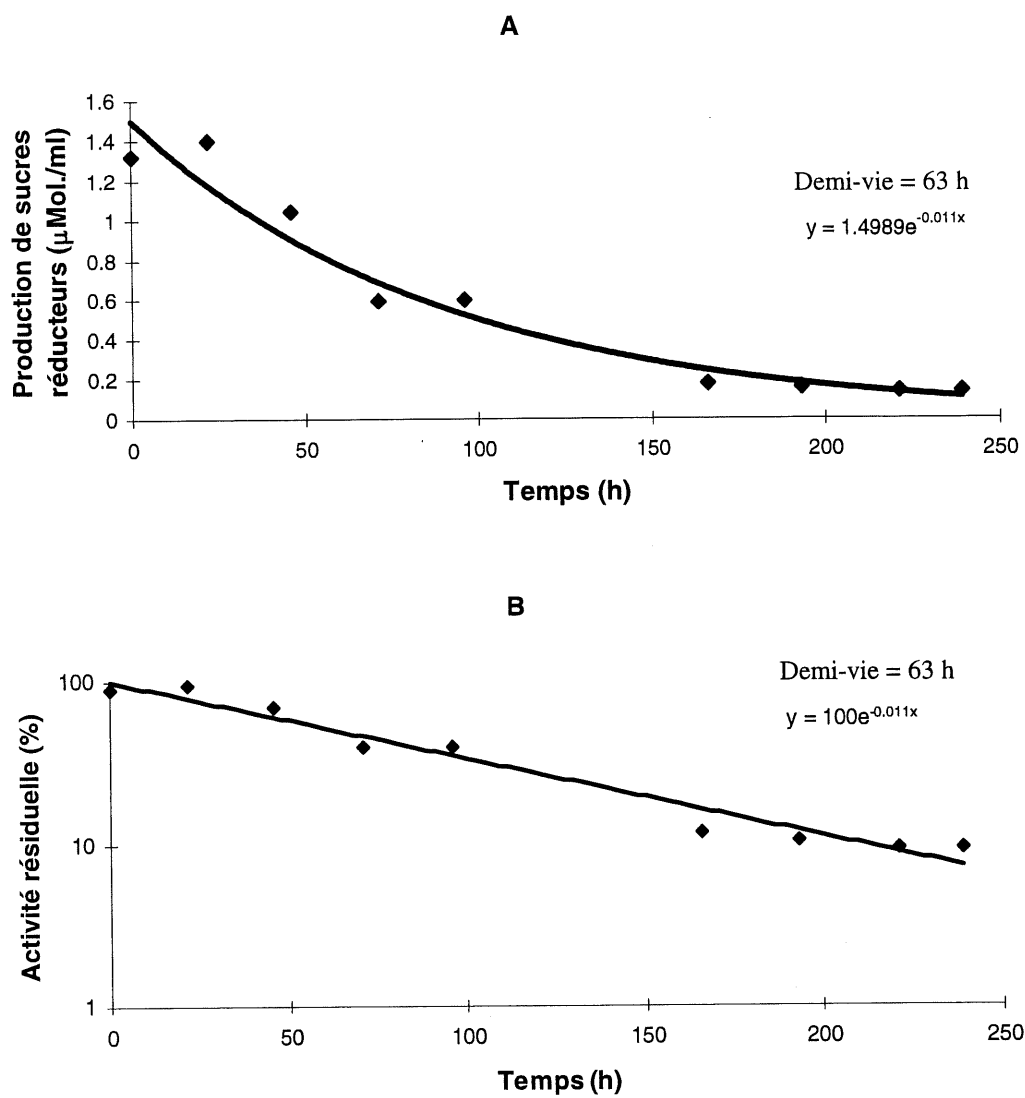
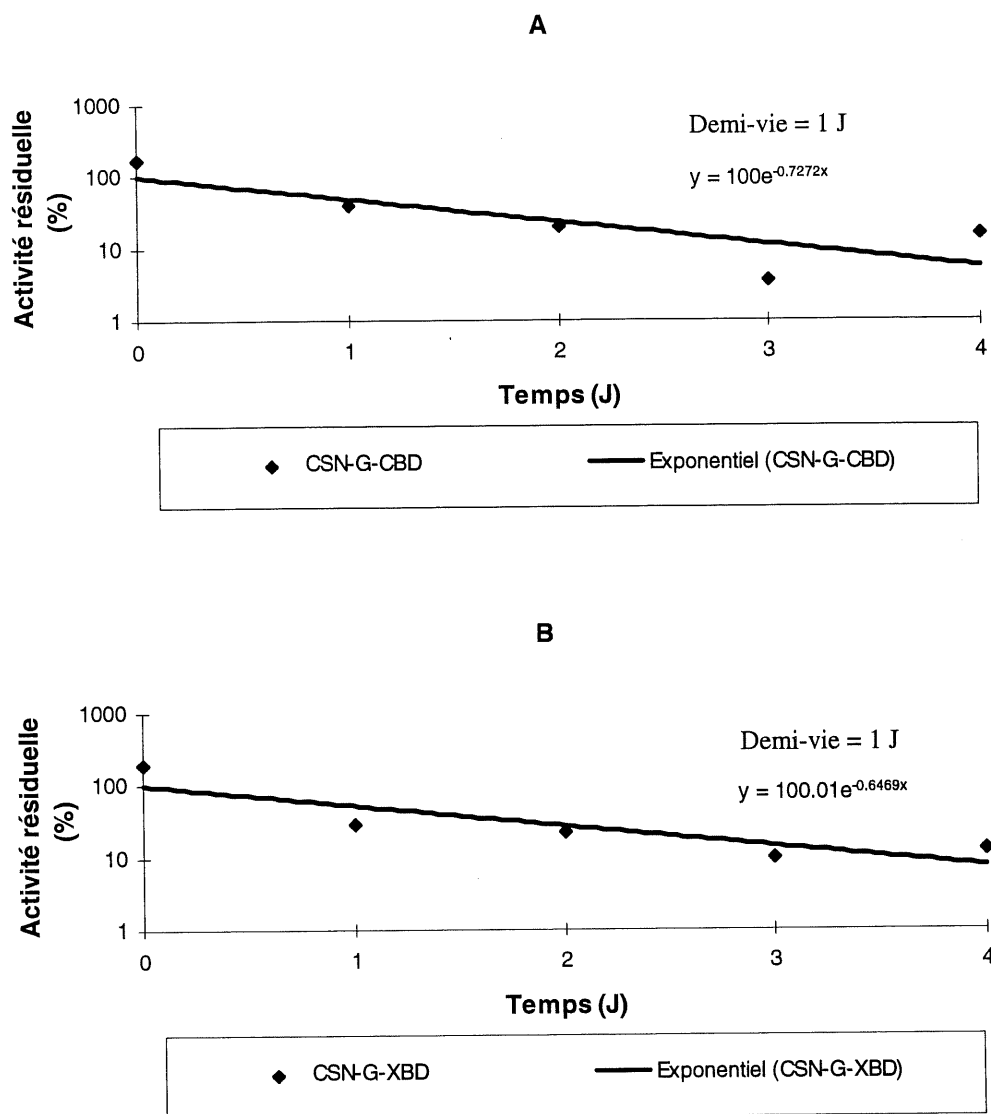


Figure 3.32 Estimation de la stabilité de l'enzyme CSN-PT-CBD_{Cex} à 45°C. Le débit appliqué était de 12.5 ml/h. Les courbes exponentielles ainsi que leurs équations représentent de manière satisfaisante les points expérimentaux. La demi-vie calculée est aussi indiquée.

Finalement, deux essais à 55°C ont démontré l'instabilité des enzymes CSN-G-XBD et CSN-G-CBD_{Cex} à cette température. La figure 3.33 présente les résultats obtenus.



3.3.4 Analyse préliminaire des hydrolysats de chitosane par HPLC

Un des intérêts de produire différentes enzymes de fusion était de vérifier si la nature de l'espaceur qui sépare les module catalytique et d'attachement peut influencer l'action des enzyme sur le substrat. Pour vérifier ce dernier point, il était prévu d'analyser les hydrolysats par chromatographie liquide à haute pression.

Malheureusement ce point n'a pu être atteint par manque de temps. Néanmoins, quelques analyses préliminaires ont pu être effectuées. Celles-ci permettent encore une fois de confirmer l'action des enzymes immobilisées sur le chitosane. La figure 3.34 montre les résultats obtenus par ce type d'analyse pour du chitosane hydrolysé par l'enzyme CSN-CBD_{Cex} immobilisée. Aucun standard de poids moléculaire n'étant disponible nos seules références sont le chitosane non hydrolysé et la D-glucosamine monomérique. Le temps d'élution du chitosane, tel que démontré à la figure 3.34, est de 12 minutes tandis que celui de la D-glucosamine est de 19 minutes (résultat non présenté).

La colonne de chromatographie utilisée sépare les molécules par le principe d'exclusion. Le déplacement du pic de chitosane vers des temps d'élution plus élevés indique donc que ce dernier est hydrolysé en molécules plus petites.

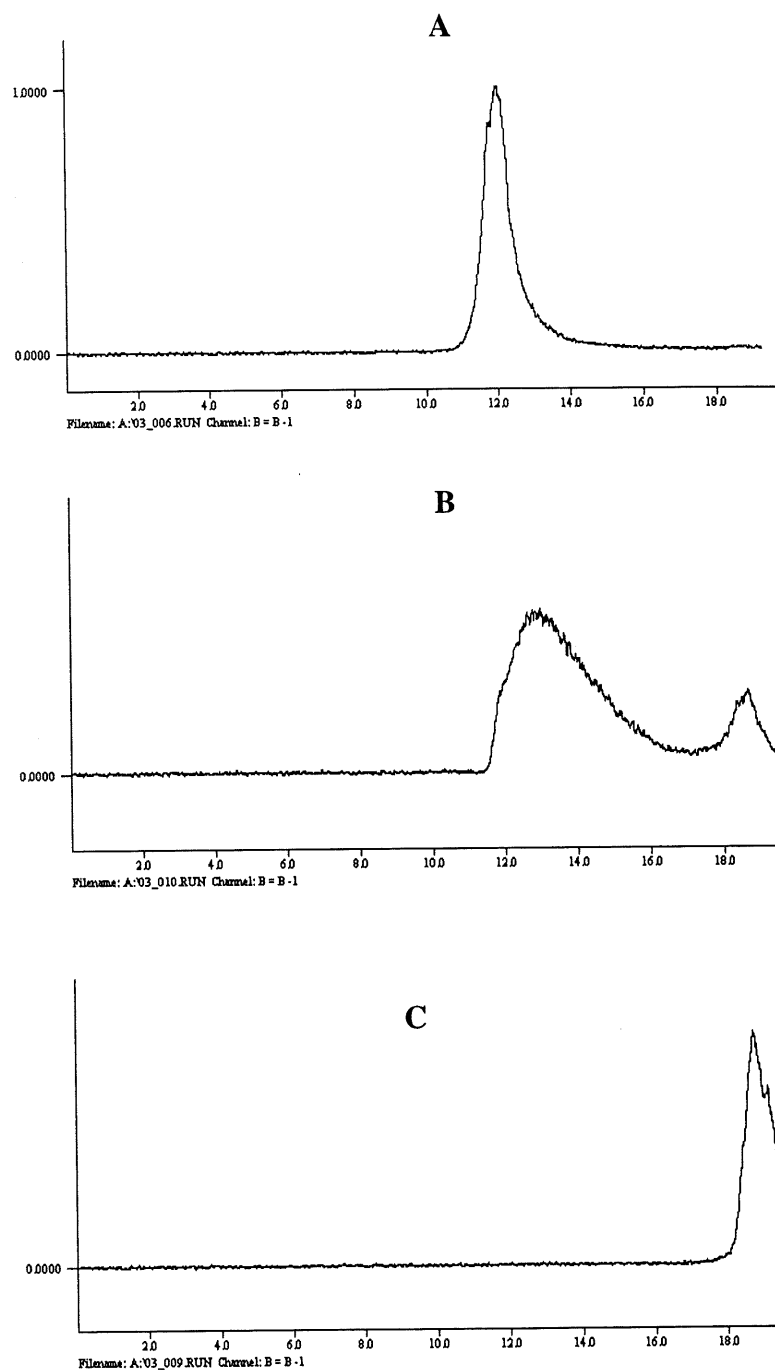


Figure 3.34: Résultats préliminaires d'analyse par chromatographie en phase liquide à haute pression. Solution de chitosane Fluka Low Molecular Weight 0.1%: A) non hydrolysée, B) hydrolysée par l'enzyme CSN-CBD_{Cex}, immobilisée dans un bioréacteur continu, au débit de 12.5 ml/h et C) au débit de 3.0 ml/h. Le temps d'élution en min. est indiqué sur l'axe des X.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Constructions génétiques

Dans la plupart des cas, les manipulations génétiques ont été réalisées en suivant les recommandations des fournisseurs et les protocoles standards du domaine de la biologie moléculaire et de la biologie des actinomycètes, abondamment décrits par Sambrook (1989) et Hopwood (1985).

Voici néanmoins une brève discussion des principales adaptations apportées à ces techniques.

D'abord les mutagénèses dirigées ont été réalisées sur l'ADN db en suivant un protocole proposé par Deng et Nickoloff (1992). Par comparaison avec leurs travaux, les plasmides mutés au cours de ce projet étaient à la fois plus longs et plus riches en nucléotides G + C. Ces deux facteurs ont pour effet d'augmenter la quantité d'énergie requise pour dénaturer les molécules d'ADN db. En suivant le protocole original, plusieurs essais infructueux ont été réalisés. Ce protocole indique de dénaturer l'ADN plasmidique db en l'incubant 3 min. à 100°C. Un test de dénaturation thermique au cours duquel les plasmides à muter ont été dénaturés et immédiatement transformés a démontré qu'après un traitement de 3 min. le taux de transformation diminuait de moins de 10%, alors qu'après un traitement de 7 min, ce taux diminuait d'environ 95% (résultats non présentés). Une adaptation du temps de dénaturation à donc été nécessaire pour réaliser les mutagénèses sur l'ADN plasmidique db. (Les plasmides mutés au cours de ce travail étaient constitués du vecteur pALTER porteur des gènes de fusion *csn-cbd_{Cex}* (pALTER390) et *csn-g-xbd* (pBP151). La taille respective de ces plasmides est 7646 et 8025 pb comparé à une taille de 5700 pb pour le plasmide muté par Deng et Nickoloff. De plus les gènes *csn-cbd_{Cex}* et *csn-g-xbd* sont constitués de modules génétiques issus du

génomique d'actinomycètes, donc riches en nucléotides G + C tandis que le plasmide muté par Deng et Nickoloff ne porte pas de telle séquence).

L'ajout d'un troisième oligonucléotide, complémentaire sur toute sa séquence et s'appariant dans une région symétriquement éloignée du site d'appariement des deux autres oligonucléotides (voir figure 3.8), est un autre ajustement qui semble avoir amélioré le taux de réussite des manipulations de mutagenèse. Cette observation n'est pas facile à valider puisque ce troisième oligonucléotide est tout à fait complémentaire au brin parental servant de matrice à la réplication. De ce fait, son incorporation dans le brin nouvellement synthétisé n'est pas vérifiable. Néanmoins, la présence de trois sites d'initiation de synthèse qui sont dispersés sur la séquence du brin parental servant de matrice, offre la possibilité que trois polymérases participent à la synthèse du nouveau brin. Ceci implique que chacune de ces trois polymérases ait une plus petite polymérisation à réaliser et donc que le taux de synthèse complète du nouveau brin soit amélioré.

Au niveau du séquençage partiel des gènes de fusion, l'utilisation d'ADN sb a permis d'obtenir de meilleurs résultats par rapport à l'utilisation d'ADN db dénaturé par traitement alcalin. Avec l'ADN db, un haut taux de compression a été observé. Ceci permet d'imaginer que, lors des mutagenèses dirigées, peu de polymérases parviennent à répliquer complètement la portion d'ADN qui la sépare de l'oligonucléotide suivant.

L'insertion des petits segments d'ADN, formés par l'appariement des oligonucléotides complémentaires, a été facilement réalisée en déphosphorylant le grand fragment d'ADN impliqué (plasmide ouvert) et en phosphorylant les oligonucléotides avant leur appariement.

4.2 Expression des gènes de fusion dans *S. lividans* TK24

Tel que démontré à la figure 3.22, l'expression des gènes de fusion a pu être observée en cultivant les souches recombinantes sur milieu solide chitosane-agar. Sur cette même figure on peut également observer la variation de la superficie des zones d'éclaircissement pour une même souche, soit *S. lividans* TK24 (pBP204). Sur un des pétris, cette zone est beaucoup plus grande que sur l'autre. Ceci démontre bien que les résultats obtenus par ce type d'expérience sont qualitatifs et que leur reproductibilité dépend de l'homogénéité du milieu de culture et de la quantité d'inoculum appliquée. Pour cette dernière raison, un gros inoculum de la souche *S. lividans* TK24 (pFD666) a été appliquée pour s'assurer de la validité du contrôle négatif.

Lors des cultures des souches recombinantes en milieu liquide, l'évolution de la quantité de protéines totales et de l'activité chitosanolytique dans les surnageants sont comparables à l'évolution observée lors de la culture de la souche *S. lividans* TK24 (pRL270)¹ produisant l'enzyme *csn* de type sauvage. Par contre les maximums atteints avec les cultures des souches recombinantes produisant les enzymes de fusion sont inférieurs de 4 à 5 fois à ceux obtenus en cultivant la souche recombinante produisant la chitosanase de type sauvage. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette observation tel que: une transcription et/ou traduction moins efficace des gènes de fusion; des modifications post-traductionnelles; une sécrétion moins efficace des enzymes de fusion; une activité spécifique réduite des enzymes de fusion par rapport à l'enzyme de type sauvage; etc.

Les analyses de protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS dénaturant nous ont fourni des renseignements supplémentaires sur l'état des enzymes de fusion dans les surnageants. Les figures 3.25 à 3.27, permettent d'observer une bande majoritaire aux environs de 30 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire de la chitosanase de type sauvage, et ce pour les six enzymes de fusion étudiées. Ces observations suggèrent que les enzymes de fusion sont protéolysées au niveau de la jonction entre les modules catalytique et d'attachement. Des

expériences supplémentaires de reconnaissance des bandes à l'aide d'anticorps dirigés contre les modules catalytique et d'attachement permettraient de s'assurer de l'origine des bandes observées. Sané (1995) a réalisé ce type d'étude pour l'enzyme CSN-CBD_{Cex} à l'aide d'anticorps reconnaissant le domaine catalytique CSN. Cette étude lui a permis de constater que les bandes observées à 30 et 40 kDa sont bien des protéines portant le module CSN. Notons finalement que Paradis et al. (1996) ont observé le même phénomène lors de la production de la xylanaseA de type sauvage chez *S. lividans*. Cette enzyme étant elle aussi clivée au niveau de l'espaceur.

Toujours selon les résultats présentés aux figures 3.25 à 3.27, les enzymes CSN-CBD_{Cex} et CSN-G-XBD seraient les plus résistantes à ce phénomène de protéolyse puisque des bandes plus fortes aux alentours de 40 kDa sont observées.

La présence d'une bande migrant aux environs de 45 kDa et la résistance de l'enzyme CSN-G-XBD face aux phénomènes de protéolyse suspectés sont deux facteurs qui suggèrent que l'enzyme en question est glycosylée. La glycosylation des espaceurs a déjà été observée. Ong et al. (1994) rapporte que la glycosylation de l'espaceur PT, contenu dans la protéine PT-CBD_{Cex}, entraîne des différences de poids moléculaires de l'ordre de 0.6 à 4.0 kDa. Dans ce cas, seul l'espaceur est glycosylé. La glycosylation peut protéger, par un phénomène d'encombrement stérique, la région amorphe de l'espaceur contre l'attaque des protéases.

Dans le cas des enzymes CSN-G-CBD_{Cex}, CSN-PT-CBD_{Cex}, CSN-POS-CBD_{Cex}, une bande très faible peut être observé aux environs de 40 kDa (figure 3.26). Ces résultats indiquent que ces trois enzymes semblent plus susceptibles à l'attaque des protéases.

Il est surprenant que l'enzyme CSN-G-CBD ne soit pas produite efficacement puisqu'elle possède le même espaceur que la protéine CSN-G-XBD.

¹ Communication personnelle orale de Boucher, I., juin 1996.

Concernant l'enzyme CSN-PT-CBD, notons que la glycosylation de l'espaceur PT a été observée par Ong et al. (1994) en produisant les protéines dans *S. lividans*. Il était donc pressenti d'observer une glycosylation de la protéine CSN-PT-CBD_{Cex}. L'analyse par électrophorèse de cette protéine permet effectivement d'observer une faible bande migrant aux environs de 45 kDa alors que le poids calculé de CSN-PT-CBD est de 41,3 kDa.

Pour tous les gènes dont nous avons discutés jusqu'ici, la bande de dégradation principale observée migre aux environs de 30 kDa, ce qui correspond au poids de la chitosanase de type sauvage. Dans le cas de l'enzyme CSN-NEG-CBD (voir figure 3.27) on observe une faible bande aux alentours de 40 kDa mais surtout la présence de trois bandes de fortes intensités migrant aux environs de 27, 30 et 32 kDa. Pour cette enzyme, il semble donc y avoir deux sites de protéolyses situés à une courte distance l'un de l'autre et probablement à la jonction des modules catalytique et d'attachement.

Dans leur ensemble, les résultats obtenus par électrophorèse des protéines totales nous indiquent clairement l'instabilité des enzymes modulaires lors de leur production par *S. lividans* TK24. Les protéines de fusion semblent fortement susceptibles à l'action des protéases. De plus les enzymes produites avec la plus grande efficacité sont les enzymes CSN-CBD_{Cex} et CSN-G-XBD.

Pour étudier plus à fond ce phénomène de protéolyse, des expériences d'immunodétection à l'aide d'anticorps dirigés contre le domaine catalytique et les domaines d'attachement seraient d'intérêt. Une séparation des peptides par chromatographie d'exclusion permettrait aussi de purifier les peptides clivés et de séquencer leur extrémité N-terminale. Dans le cas où un site de clivage préférentiel serait observé, ce genre d'étude pourrait mener à la mutagenèse de la région génétique codant pour les acides aminés impliqués. Ceci permettrait d'augmenter la résistance de l'enzyme face aux protéases. Puisque toutes ces étapes nécessitent du matériel et du temps non négligeable, il est préférable de déterminer l'enzyme qui correspond le mieux aux besoins et d'entreprendre ce genre de travaux pour cette enzyme seulement.

4.3 Études des enzymes modulaires en bioréacteur

Malgré la faible quantité de certaines enzymes sous leur forme modulaire complète, chacune, à l'exception de CSN-POS-CBD, a pu être immobilisée sur un support de cellulose. (Dans le cas de l'enzyme avec l'espaceur POS, des contraintes de temps expliquent qu'aucune expérience d'immobilisation n'ait été effectuée). Sous leur forme immobilisée, chacune des enzymes a démontré une action d'hydrolyse sur le chitosane.

Cette première constatation suggère la présence d'enzyme modulaire complète dans tous les surnageants utilisés pour les immobilisations. Ceci malgré les résultats d'analyses des protéines totales par électrophorèse qui indiquaient, dans plusieurs cas, la faible quantité de protéine migrant aux poids attendus des enzyme de fusion. Cette observation suggère que la transcription / traduction complète des gènes de fusion est possible.

Tel qu'attendu, le taux d'hydrolyse du substrat en bioréacteur varie en fonction du débit appliqué. L'analyse par HPLC démontre clairement que l'augmentation de la concentration de sucres réducteurs est due à l'hydrolyse du chitosane dont le pic d'élution est déplacé vers des temps d'élution supérieurs (séparation par chromatographie d'exclusion).

Nous avons aussi pu démontrer que la stabilité des enzymes immobilisées est supérieure, à 37°C, à celle de l'enzyme sauvage en solution. Les essais à 45 et 55°C démontrent une chute rapide de la stabilité des enzymes à ces températures. L'augmentation de la thermostabilité des enzymes serait un avantage considérable puisque la solution de chitosane est visqueuse et qu'une augmentation de la température permettrait d'augmenter les concentrations appliquées lors des essais en bioréacteurs.

Dans leur ensemble, les résultats de l'étude des enzymes en bioréacteurs ne permettent pas de conclure qu'une enzyme se démarque des autres en terme de stabilité. Néanmoins, il apparaît que les enzymes immobilisées ont une stabilité accrue par rapport à l'enzyme de type sauvage utilisée en solution.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude démontrent clairement la possibilité d'utiliser des chitosanases modulaires munies d'un domaine d'attachement à la cellulose dans l'élaboration d'un procédé d'hydrolyse du chitosane en continue.

Parmi les principaux avantages d'un tel procédé, notons: 1- la possibilité d'ajuster le degré d'hydrolyse en faisant varier le débit d'écoulement du substrat; 2- l'utilisation extensive (ou répétée) des enzymes immobilisées; 3- l'augmentation de la stabilité des enzymes immobilisées par rapport aux enzymes en solution; 4- la génération de produits exempts d'enzyme. Dans cette étude, ces quatre aspects ont tous été validés pour l'utilisation de chitosanases modulaires immobilisées sur support de cellulose.

Six gènes de fusion ont été créés et exprimés dans *S. lividans* TK24. Les six enzymes modulaires qu'ils génèrent présentent une variété de possibilités d'espaceurs et de module d'attachement. Une étude extensive de ces protéines devrait permettre de vérifier l'influence des domaines espaceur et d'attachement sur la stabilité et l'activité des enzymes modulaires. Entre autre, il serait intéressant d'observer une influence sur la spécificité des enzymes face au substrat qui permettrait de favoriser la reconnaissance et l'hydrolyse des grandes molécules de substrat au détriment des petites molécules.

Finalement il sera important d'améliorer le taux de production d'enzymes modulaires intactes pour que ce système soit pleinement avantageux par rapport à la liaison covalente des enzymes par moyen chimique. Pour l'instant, le système d'enzymes modulaires présente le grand avantage de permettre une immobilisation par simple contact des particules de cellulose avec les surnageants de culture. En contre partie, une trop faible quantité d'enzymes immobilisables dans ces surnageants présenterait un désavantage majeur.

Annexe 1

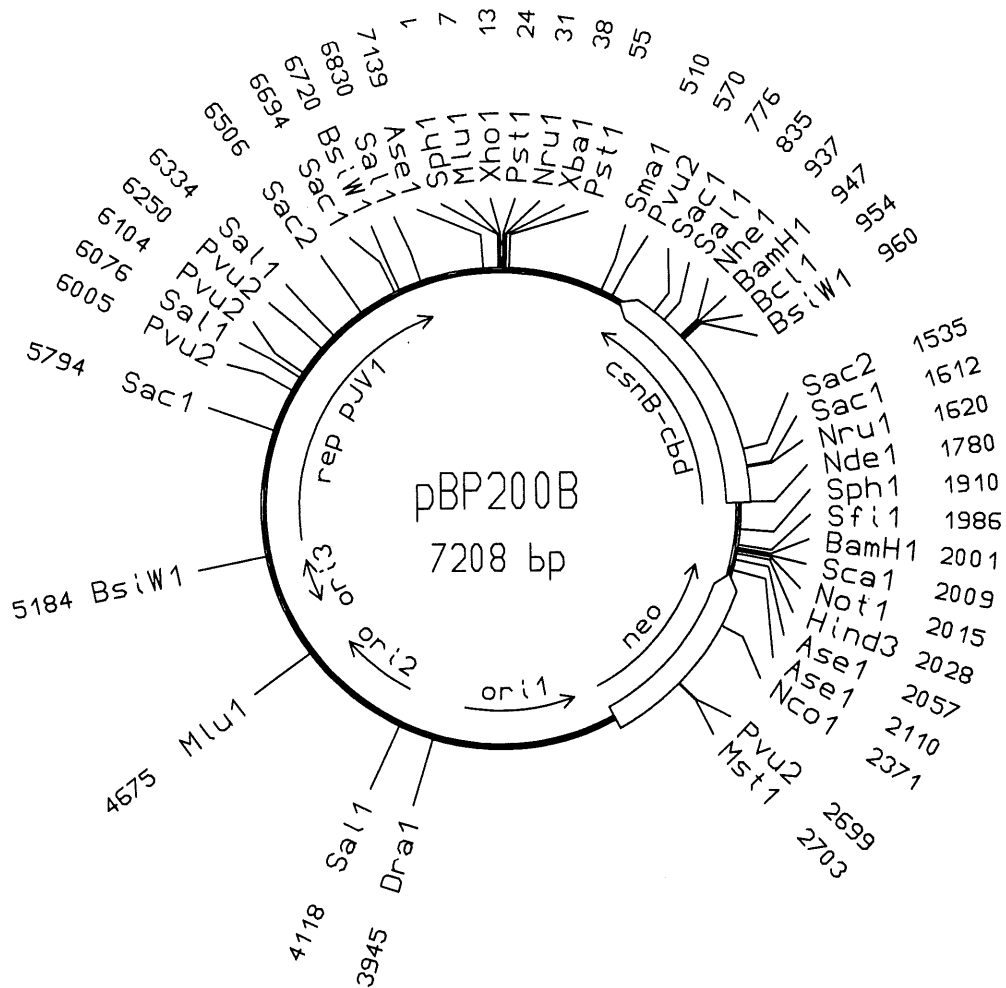


Figure A-1: Carte physique du plasmide pBP200B. Seuls les sites de restriction présents à deux positions ou moins sont représentés. Ori1 = origine de répllication d'*E. coli* ; ori2 = origine de répllication du phage M13 ; ori3 = origine de répllication du plasmide pJV1 de *Streptomyces phaeochromogenes*; neo : gène de résistance à la kanamycine (Denis et Brzezinski, 1992).

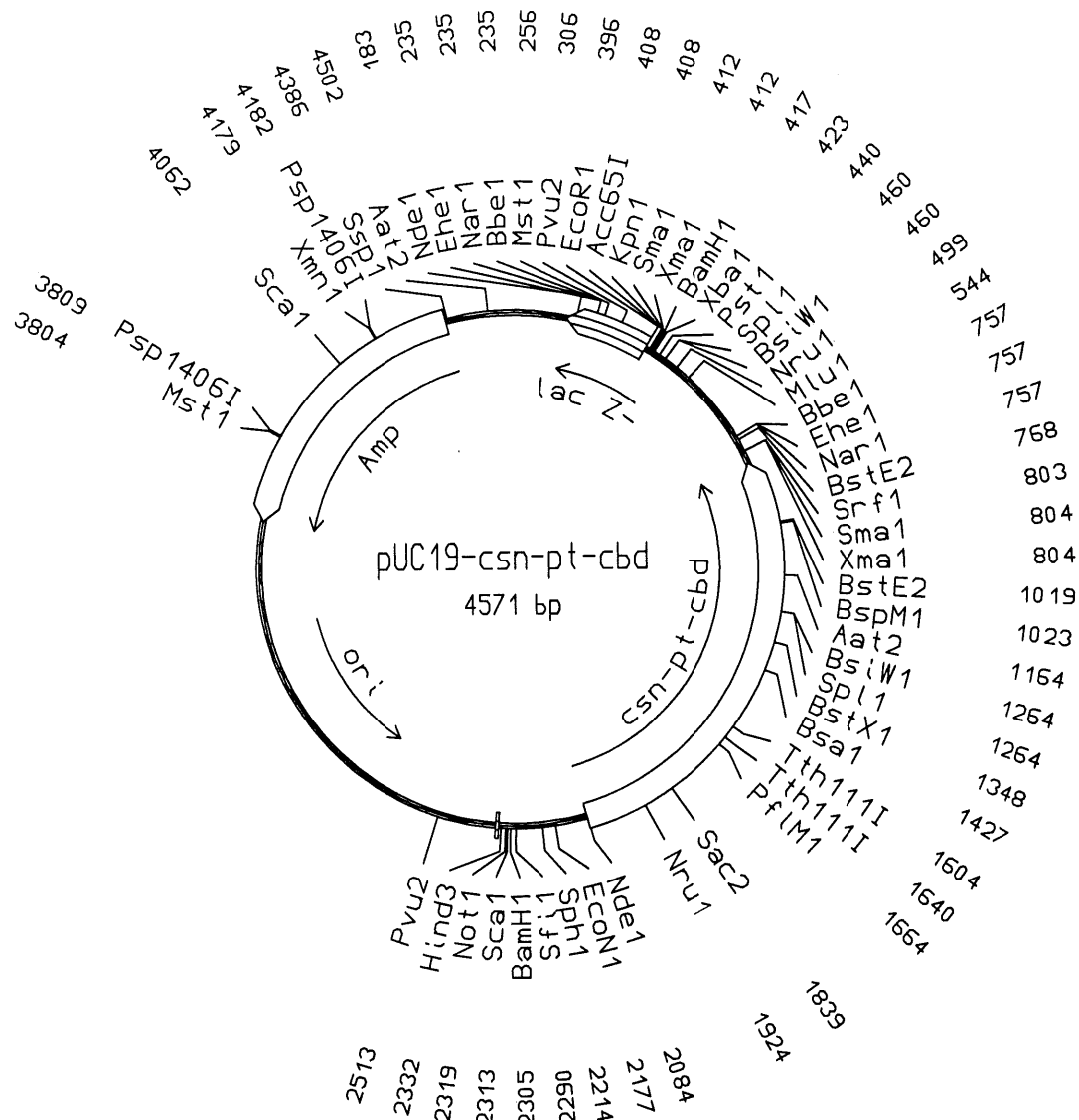


Figure A-3: Carte physique du plasmide pUC19_{csn-pt-cbd}_{Cex}. Seuls les sites de restriction présents à deux positions ou moins sont représentés. Amp : gène de résistance à l'ampicilline; ori : origine de répliation chez *E. coli*; LacZ⁻ : séquence interrompue du module lacZ.

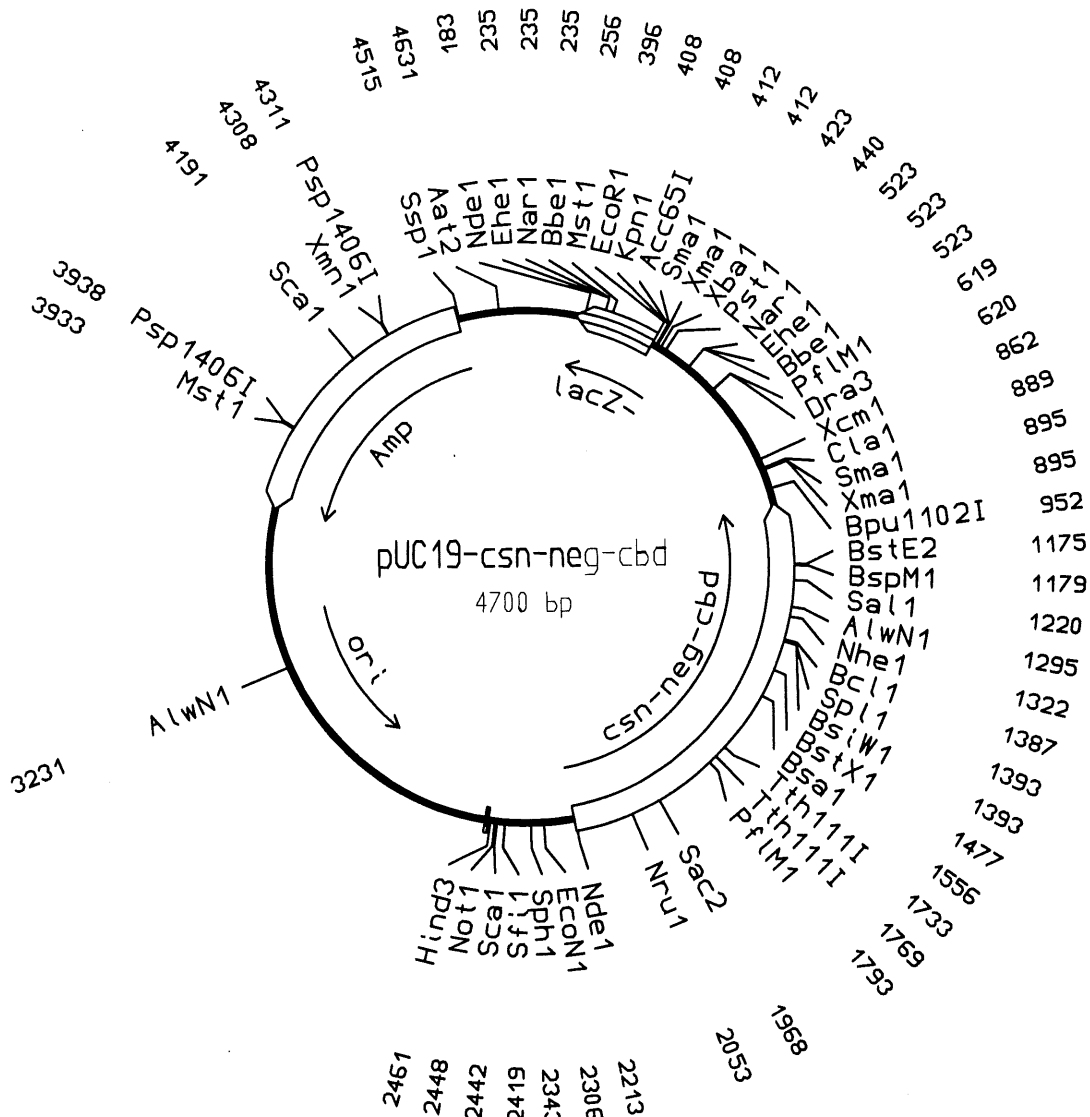


Figure A-4: Carte physique du plasmide pUC19csn-neg-cbd_{Cex}. Seuls les sites de restriction présents à deux positions ou moins sont représentés. Amp : gène de résistance à l'ampicilline; ori : origine de réplication chez *E. coli*; LacZ- : séquence interrompue du module lacZ.

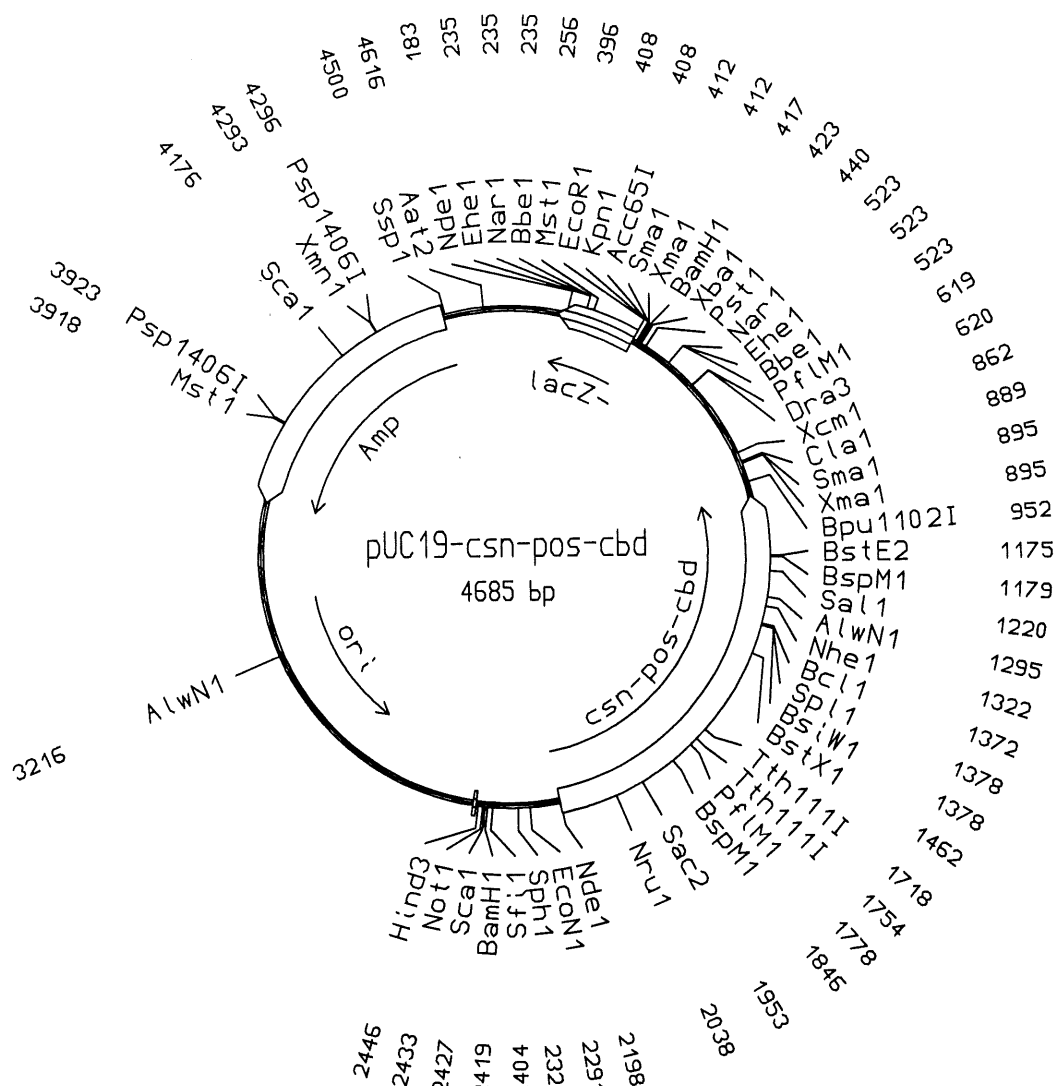


Figure A-6: Carte physique du plasmide pUC19 $_{csn-pos-cbd_{Cex}}$. Seuls les sites de restriction présents à deux positions ou moins sont représentés. Amp : gène de résistance à l'ampicilline; ori : origine de réplication chez *E. coli*; LacZ- : séquence interrompue du module lacZ.

ANNEXE 2

```

GGATCCGTCGCGGGCGGGGCCCCCTCTGCGTGTCCGGGCTCCTCTGCGTGAGCCGGAGTCTGACGGTCCGTCACCTCGGTGGCGGATCGTT 90
GGCATGCGCGCGGTACAGGATTTGGGGCGGGGCCCTTGCGGAGGGCCGGGAGGGGGCGCTTGAATCGGTTAGGAAAGTTTCCTAACTCTC 180
TCTGCGGGCACCCCCATGCCAGCGACAGAAAGACGGAGCGTCATATGCACTCGCAGCACCGGACCGCACGATCGCCCTGGCCGTCGTCC 270
M H S Q H R T A R I A L A V V 15
TCACCGCGATACCCGCATCGCTCGCCACCGCCGGAGTCGGCTACGCCTCCACTCAGGCGAGCACCGCCGTCGAAGGCCGGTGCCGGCCTCG 360
L T A I P A S L A T A G V G Y A S T Q A S T A V K A G A G L 45
ACGATCCCCACAAGAAGGAGATCGCGATGGAGCTCGTCTCCAGCGCCGAGAACTCCTCCCTCGACTGGAAGGCCAGTACAAGTACATCG 450
D D P H K K E I E M A L V S S A E N S S L D W K A Q Y K Y I 75
AGGACATCGGTGACGGCCGCGGTACACCGCGCGCATCATCGGCTTCTGTTCGGGACCGCGGACATGCTGGAAGTCTCGTCAGCACTACA 540
E D I G D G R G Y T G G I I G F C S G T G D M L E L V Q H Y 105
CCGACCTGGAGCCCGGCAACATCTCTGCCAAGTACCTGCCCGCGCTGAAGAAGGTCAACGGCTCGGCCTCCCACTCCGGCTCGGCACCC 630
T D L E P G N I L A K Y L P A L K K V N G S A S H S G L G T 135
CGTTACCAAGGACTGGGCGACCGCCGCAAGGACACCGTCTTCAGCAGGCCAGAAACGACGACGCGGCGGCTACTTCGACCCGG 720
P F T K D W A T A A K D T V F Q Q A Q N D E R D R V Y F D P 165
CCGTGAGCCAGGCGAAGGCCGACGGCTGCGCGCGCTGGGCGAGTTCGCCTACTACGACGCCATCGTGATGCACGGCCCCGGCAACGACC 810
A V S Q A K A D G L R A L G Q F A Y Y D A I V M H G P G N D 195
CGACCAAGTTCGGTGGCATCCGCAAGACCGCCATGAAGAAGGCCAGGACCCCGCCCGGGCGGCGACGAGACCACTACCTCAACGCCCT 900
P T S F G G I R K T A M K K A R T P A Q G G D E T T Y L N A 225
TCCTGGAGCCCGCAAGGCCCGCATGCTCACCAGGCGCGCCAGCAGCAGCAGCCGCGTGGACACCGAGCAGCGGGTCTTCTCTGAAGG 990
F L D A R K A A M L T E A A H D D T S R V D T E Q R V F L K 255
CCGGCAACCTCGACCTCAACCCCGCGCTGAAGTGAAGACCTACGGGGACCCGTACGTGATCGGGGATCCTCTAGCTAGCTCCGGTCCGG 1080
A G N L D L N P P L K W K T Y G D P Y V I G A P L A S S G P 285
CCGGGTGCCAGGTGCTGTGGGGCGTCAACCAAGTGAACACCGGCTTACCCGCAACGTCACCGTGAAGAACACGTCCTCCGCTCCGGTCTG 1170
A G C Q V L W G V N Q W N T G F T A N V T V K N T S S A P V 315
ACGGCTGGACGCTCAGTTTCAGCTTCCCGTCCGGCCAGCAGGTACCCAGGCGTGGAGCTCGACGGTCACGAGTCCGGCTCCGGCCGTGA 1260
D G W T L T F S F P S G Q Q V T Q A W S S T V T Q S G S A V 345
CGGTCCGCAACGCCCCGTGGAACGGCTCGATCCCGCGGGCGGCACCCGCGCAGTTCGGCTTCAACGGCTCGCACAGGGCACCAACGCCG 1350
T V R N A P W N G S I P A G G T A Q F G F N G S H T G T N A 375
CGCCGACGGCGTCTCTGCTCAACGGCACGCCCCTGCACGGTCCGGTGACGGGCGGTCCGGTCTGTCGGGTCCCGACGGGCCCCGGGCACCGGGC 1440
A P T A F S L N G T P C T V G * 390
CGGTGGTCGCGCACGCCGCGCGGTACCGGCCCGCGCGCTGCGCTCGATACGCTGGGCCGATGAGCACCGACGCGGGCGACCGGACCA 1530
CCTACCTGCTCGTCGACGGCGAGAACATCGACCGGACGCTGGGCTCGTCGATCCTCGGCGGCCGGCCGACTCCCGAGCAGCGCCCGCGCT 1620
GGGAGCGGGTCTGGGTTTCGCGCAGCAGGCGTGGGGGCGCCGCTCAAGGCGCTGTTCTTCTCAACGCGTGAACGGGTCCCTGCCGA 1710
TGTCGTTCTGTCAGGCGCTGCTCGCGATCGGGTTCACGCCCATCCCCCTGTGCGGCGAGTCTGACGAGAAGGTCTGTCGACCTGCAG 1796

```

Figure A-8: Séquence génétique du gène de fusion *csn-cbd* et séquence d'acides aminés déduite. La composition en a.a. est la suivante: 1-40 peptide signal et 41-276 module catalytique *csn* de *Streptomyces* sp. N174; 277-282 a.a. codés par une portion du SCM de pTZ18R; 283-390 domaine d'attachement à la cellulose de *C. fimi*. La région correspondante au *cbd* est soulignée. Le site de clivage du peptide signal est indiqué par une flèche.

```

GGATCCGTCGGGGGGGGGGCCCTCTGCGTGTCCGGGCTCCTCTGCGTGAGCCGGAGTCTGACGGTCCGTCACCTTCGGTGGCGGATCGTT 90
GGCATGCGCGCGGTACGGGATTTGGGGCGGGGCCCTTGCGGAGGGCCGGGAGGGGGCGCTTGAATCGGTTAGGAAAGTTTCTTAACCTCTC 180
TCTCGGGGACCCCCATGCCAGCGACAGAAGACGGAGCGTCATATGCACCTCGCAGCACCGGACCGCACGCATCGCCCTGGCCGTCGTCC 270
M H S Q H R T A R I A L A V V 15
TCACCGCGATACCCGCATCGCTCGCCACCGCCGGAGTCGGCTACGCCTCCACTCAGGCGAGCACCGCCGTCAAGGCCGGTGCGGCCCTCG 360
L T A I P A S L A T A G V G Y A S T Q A S T A V K A G A G L 45
ACGATCCCCACAAGAAGGAGATCGCGATGGAGCTCGTCTCCAGCGCGAGAACTCCTCCCTCGACTGGAAGGCCAGTACAAGTACATCG 450
D D P H K K E I E M A L V S S A E N S S L D W K A Q Y K Y I 75
AGGACATCGGTGACGGCCGCGGCTACACCGCGCGCATCATCGGCTTCTGTTCGGGACCGCGACATGCTGGAAGTCTCGTCCAGCACTACA 540
E D I G D G R G Y T G G I I G F C S G T G D M L E L V Q H Y 105
CCGACCTGGAGCCCGCAACATCTCGCCAAAGTACCTGCCCGCGCTGAAGAAGGTCAACGGCTCGGCCTCCACTCCGGCTCGGCACCC 630
T D L E P G N I L A K Y L P A L K K V N G S A S H S G L G T 135
CGTTACCAAGGACTGGGCGACCGCGCCCAAGGACACCGTCTTCCAGCAGGCCAGAACGACGAGCGCGACCGGGTCTACTTCGACCCGG 720
P F T K D W A T A A K D T V F Q Q A Q N D E R D R V Y F D P 165
CCGTGACCCAGGCGAAGGCCGACGGCTGCGCGCGCTGGGCGAGTTCGCCTACTACGACGCCATCGTGATGCACGGCCCGGCAACGACC 810
A V S Q A K A D G L R A L G Q F A Y Y D A I V M H G P G N D 195
CGACCAAGTTCGGTGGCATCCGCAAGACCGCCATGAAGAAGGCCAGGACCCCGCCAGGGCGGCGACGAGACCACTACCTCAACGCCT 900
P T S F G G I R K T A M K K A R T P A Q G G D E T T Y L N A 225
TCCTGGACGCCCGCAAGGCCGCCATGCTCACCGAGGCCGCGCACGACGACACCGCCGCGTGGACACCGAGCAGCGGGTCTTCTGTAAGG 990
F L D A R K A A M L T E A A H D D T S R V D T E Q R V F L K 255
CCGGCAACCTCGACCTCAACCCGCGCTGAAGTGAAGACCTACGGGGACCGGTACGTGATCAGGGATCCTCTAGCTAGCTCCGGTCCGG 1080
A G N L D L N P P L K W K T Y G D P Y V I R A P L A S S G P 285
CCGGGTGCCAGGTGCTGTGGGGCGTCAACCAAGTGAACACCGGCTTACCGCGAAGCTCACCGTGAAGAACAGTCTCCGCTCCGGTCCG 1170
A G C Q V L W G V N Q W N T G F T A N V T V K N T S S A P V 315
ACGGCTGGACGCTCACGTTCAAGTTCCCGTCCGGCCAGCAGGTACCCAGGCGTGGAGCTCGACGGTCAAGCAGTCCGGCTCCGGCCGTGA 1260
D G W T L T F S F P S G Q Q V T Q A W S S T V T Q S G S A V 345
CGGTCCGCAACGCCCGTGAACCGGCTCGATCCCGGGCGGGGACCGCGCAGTTCGGCTTCAACGGCTCGCACACGGGCACCAACGCGG 1350
T V R N A P W N G S I P A G G T A Q F G F N G S H T G T N A 375
CGCCGACGGCGTCTCGCTCAACGGCACGCCCTGCACGGTCCGGCTGACGGGCCGTCGGTTCGTTCGGGTCCCGACGGGCCCGGGCACCGGG 1440
A P T A F S L N G T P C T V G * 390
CGGTGGTCGCGCACGCCCGCGGGTCACCGGCCCGCGCGCTGCGTTCGATACGCTGGGCGGATGAGCACCGACCGGGCGACCGGACCA 1530
CCTACCTGCTCGTCGACGGCGGAACATCGACGCGACGCTGGGCTCGTTCGATCCCTCGGCGGGCGGGCGACTCCCGAGCAGCGCCCGCGCT 1620
GGGAGCGGGTGTGGGTTTCGCGCAGCAGGCGTGGGGGCGCGGTCGAAGGCGCTGTTCTTCTCAACGCGTCGAACGGGTCCCTGCCGA 1710
TGTCGTTCTGTCAGGCGCTGCTCGGATCGGGTTCACGCCCATCCCCCTGTCGGGCGAGTCTGTACGAGAAGGTCGTCGACCTGCAG 1796

```

Figure A-9: Séquence génétique du gène de fusion *csnB-cbd* et séquence d'acides aminés déduite. La composition en a.a. est la suivante: 1-40 peptide signal et 41-276 module catalytique CSN de *Streptomyces sp.* N174; 277, a.a. codé par le codon muté lors de la création du site de restriction *BclII* par mutagenèse dirigée; 278-282 a.a. codés par une portion du SCM de pTZ18R; 283-390 domaine d'attachement CBD_{cex} de *C. fimi*. La région correspondante au CBD est soulignée. Le site de clivage du peptide signal est indiqué par une flèche simple. Le nucléotide muté pour introduire le site de restriction *BclII* est indiqué par une flèche double.

BIBLIOGRAPHIE

- AKIYAMA, K., K. KAWAZU et A. KOBAYASHI. 1995. A novel method for chemo-enzymatic synthesis of elicitor-active chitosan oligomers and partially N-deacetylated chitin oligomers using N-acetylated chitotrioses as substrates in a lysozyme-catalyzed transglycosylation reaction system. *Carbohydr. Res.* 279: 151-160.
- BENHAMOU, N., P.J. LAFONTAINE et M. NICOLE. 1994. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology*. 84(12): 1432-1444.
- BLACK, G.W., G.P. HAZELWOOD, S.J. MILLWARD-SADLER, J.I. LAURIE et H.J. GILBERT. 1995. A modular xylanase containing a novel non-catalytic xylan-specific binding domain. *Biochem. J.* 307:191-195.
- BOSSO, C., J. DEFAYE, A. DOMARD et A. GADELLE. 1986. The behavior of chitin towards anhydrous hydrogen fluoride. Preparation of β -(1 \rightarrow 4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyl oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 156: 57-68.
- BOUCHER, I., T. FUKAMIZO, Y. HONDA, G.E. WILICK, W.A. NEUGEBAUER et R. BRZEZINSKI. 1995. Site-directed mutagenesis of evolutionary conserved carboxylic amino acids in the chitosanase from *Streptomyces* sp. N174 reveals two residues essential for catalysis. *J. Biol. Chem.* 270(52): 31077-31082.
- CHEN, R.H. et M.L. TSAIH. 1997. Effect of preparation method and characteristics of chitosan on the mechanical and release properties of the prepared capsule. *Journal of Applied Polymer Science*. 66(1): 161-169.
- COUTOULY, G. 1991. Génie enzymatique. Masson et Doin, Paris, 244 p.
- DAVIS, B. et D.E. EVELEIGH. 1984. Chitosanases: Occurrence, production and immobilization. pp 161-179. Dans: Chitin, chitosan and related enzymes. Academic Press Inc. Orlando. FL.
- DENIS, F. ET R. BRZEZINSKI. 1992. A versatile shuttle cosmid vector for use in *Escherichia coli* and actinomycetes. *Gene*. 111: 115-118.
- DENG, W.P. et J.A. NICKOLOFF. 1992. Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* 200: 81-88.
- DEWITT, J.P. 1985. Evidence for a sex factor in *Streptomyces erythreus*. *J. Bacteriol.* 164: 969-971.

DOMARD, A. et N. CARTIER. 1989. Glucosamine oligomers: 1. Preparation and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* 11: 297-302.

DUTTON, M.V., N.M. RIGBY et A.J. MACDOUGALL. 1997. Induced resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, through the treatment of surface wounds of potato tubers with elicitors. *Phytopathol. Berl.* 145(4): 163-169.

GILKES, N.R., B. HENRISSAT, D.G. KILBURN, R.C. MILLER, Jr. et R.A.J. WARREN. 1991. Domains in microbial β -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol. Rev.* 55(2): 303-315.

HIRANO, S. 1997. Chitin and chitosan: molecular and biological functions newly generated by chemical modification. *Cahier des résumés de la 7ème Conférence Internationale sur la Chitine et le Chitosane*, Lyon, France.

HOFFRÉN, A.M., T.T. TEERI, et O. TELEMAN. 1995. Modular dynamics simulation of fungal cellulose-binding domains: differences in molecular rigidity but a preserved cellulose-binding surface. *Protein Engineering.* 8(5): 443-450.

HOPWOOD, D.A., M.J. BIBB, K.F. CHATER, T. KIESER, C.J. BRUTON, H.M. KIESER, D.J. LYDIATE, C.P. SMITH, J.M. WARD et H. SCHREMPF. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England. 356 p.

HOROWITZ, S.T., S. ROSEMAN et H.J. BLUMENTHAL. 1957. The preparation of glucosamine oligosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 5046-5049.

HUDSON, S.M. 1997. Textile applications of chitin and chitosan. *Cahier des résumés de la 7ème Conférence Internationale sur la Chitine et le Chitosane*, Lyon, France.

JOSEPH, R. et D. SOMASHEKAR. 1996. Chitosanases - Properties and applications: a review. *Bioresource Technology.* 55: 35-45.

KUCHITSU, K., Y. YAZAKI, K. SAKANO et N. SHIBUYA. 1997. Transient cytoplasmic pH change and ion fluxes through the plasma membrane in suspension-cultured rice cells triggered by N-acetylchitoooligosaccharide elicitor. *Plant Cell Physiol.* 38(9): 1012-1018.

KYAW, C.M., R.C. ARAUJO, F.F. VALÊNCIA, M.S.S. FELIPE, et S. ASTOLFI-FILHO. 1994. Construction of a bifunctional protein with IgG- and cellulose-binding activities. *Bioresource Technology.* 50:31-35.

LAFONTAINE, P.J. et N. BENHAMOU. 1996. Chitosan treatment - an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by *Fusarium oxysporum* F sp. *radicis-lycopersici*. *Biocontrol Science & Technology.* 6(1): 111-124.

- LAMED, R., J. TORMO, A.J. CHIRINO, E. MORAG et E.A. BAYER. 1994. Crystalization and preliminary X-ray analysis of the major cellulose-binding domain of the cellulosome from *Clostridium thermocellum*. J. Mol. Biol. 244(2): 236-237.
- LEGOUILL C., J.L. PARENT, M. ROLA-PLESZCZYNSKI et J. STANKOVA. 1994. Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. Anal. Biochem. 219(1): 164.
- LEHOUX, J.G. et F. GRONDIN. 1993. Some effects of chitosan on liver function in the rat. Endocrinology. 132(3): 1078-1084.
- LEVER, M. 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. Anal. biochem. 47: 273-279.
- LI, T., R. BRZEZINSKI et C. BEAULIEU. 1995. Enzymatic production of chitosan oligomers. Plant Physiol. Biochem. 33(5): 599-603.
- MASSON, J-Y., T. LI, I. BOUCHER, C. BEAULIEU, et R. BRZEZINSKI. 1993. Factors governing an efficient chitosanase production by recombinant *Streptomyces lividans* strains carrying the cloned *chs* gene from *Streptomyces* N174. Pp. 423-430. Dans Chitin Enzymology, R.A.A. Muzzarelli, ed. Ancona, Italie.
- MASSON, J-Y., F. DENIS et R. BRZEZINSKI. 1994. Primary sequence of the chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174 and comparison with other endoglycosidases. Gene. 140:103-107.
- MILLWARD-SADLER, S.J., D.M. POOLE, B. HENRISSAT, G.P. HAZELWOOD, J.H. CLARKE et H.J. GILBERT. 1994. Evidence for a general role for high-affinity non-catalytic cellulose-binding domains in microbial plant cell wall hydrolases. Mol. Microbiol. 11(2): 375-382.
- MURAKI, E., F. YAKU et H. KOJIMA. 1993. Preparation and crystalization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8. Carbohydr. Res. 239: 227-237.
- MUZZARELLI, R.A.A., M.M. BELMONTE, B. MUZZARELLI et L. SIMONELLI. 1997. Modified chitosans for soft tissue and bone regeneration. Cahier des résumés de la 7ème Conférence Internationale sur la Chitine et le Chitosane, Lyon, France.
- ONG, E., N.R. GILKES, R.C. MILLER, Jr., R.A.J. WARREN et D.G. KILBURN. 1991. Enzyme immobilization using a cellulose-binding domain: Properties of a β -glucosidase fusion protein. Enzyme Microb. Technol. 13: 59-65.

ONG, E, D.G. KILBURN, R.C. MILLER, Jr et R.A.J. WARREN. 1994. *Streptomyces lividans* glycosylates the linker region of a β -1,4-glycanase from *Cellulomonas fimi*. J. Bacteriol. 176(4): 999-1008.

ONG, E., J.B. ALIMONTI, J.M. GREENWOOD, R.C. MILLER, Jr., R.A.J. WARREN et D.G. KILBURN. 1995. Purification of human interleukin-2 using the cellulose-binding domain of a prokaryotic cellulase. Bioseparation. 5:95-104.

OUNGBHO, K. et B.W. MULLER. 1997. Chitosan sponges as sustained release drug carriers. Int. Pharm. Amst. 156(2): 229-237.

PARADIS, F.W., F. SHARECK, C. DUPONT, D. KLUEPFEL et R. MOROSOLI. 1996. Expression and secretion of β -glucuronidase and *Pertussis* toxin S1 by *Streptomyces lividans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45: 646-651.

PINOTTI, A., A. BEVILACQUA et N. ZARITZKY. 1997. Optimization of the flocculation stage in a model system of food emulsion waste using chitosan as polyelectrolyte. Journal of Food Eng. 32(1): 69-81.

POPP, M.P., M.S. LESNEY et J.M. DAVIS. 1996. Defense response elicited in pine cell suspension cultures. Plant Cell Tissue Organ Cult. 47(3): 199-205.

PRENOSIL, J.E., I.J. DUNN et E. HEINZLE. 1987. Biocatalyst reaction engineering. Pp. 489-546 dans Biotechnology, vol. 7a. Éditeur: J.F. Kennedy. VCH, New York, 761 p.

SAMAIN, E., S. DROUILLARD, A. HEYRAUD, H. DRIGUEZ et R.A. GEREMIA. 1997. Gram-scales synthesis of recombinant chitoooligosaccharides in *Escherichia coli*. Carbohydr. Res. 302(1): 35-42.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

SANGER, F., S. NICKLEN et A.R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467.

SANÉ, A. 1995. Fusion de la chitosanase de *Streptomyces lividans* N174 avec un module d'attachement à la cellulose et étude de la protéine modifiée. Mémoire de maîtrise. Université de Sherbrooke, Sherbrooke.

SENG, J.M. 1988. Chitine, chitosane et dérivés: de nouvelles perspectives pour l'industrie. Biofutur. Septembre. p.40-44.

SHARECK, F., P. BIELY, R. MOROSOLI et D. KLUEPFEL. 1995. Analysis of DNA flanking the *xlnB* locus of *Streptomyces lividans* reveals genes encoding acetyl xylan esterase and the RNA component of ribonuclease P. *Gene*. 153: 105-109.

SOMASHEKAR, D. et R. JOSEPH. 1996. Chitosanases - Properties and applications: A review. *Bioresource Technology*. 55: 35-45.

SPIRO, R.G. 1966. The Nelson-Somogyi copper reduction method. *Meth. Enzymol.* 8: 7-9.

TCHOBANOGLIOUS, G. et E.D. SCHROEDER. 1987. Water quality. Addison-Wesley Publishing Company, USA, pp. 768.

TERBOJEVICH, T., A. COSANI, et R.A.A. MUZZARELLI. 1996. Molecular parameters of chitosan depolymerized with the aid of papain. *Carbohydr. Res.* 29(1): 63-68.

TOMME, P., R.A.J. WARREN, R.C. MILLER, Jr., D.G. KILBURN et N.R. GILKES. 1995. Cellulose-binding domains: Classification and properties. pp. 142-163. Dans: *Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates*. American Chemical Society. USA.

TOZAKI, H., J. KOMOIKE, C. TADA, T. MARUYAMA, A. TERABE, T. SUZUKI, A. YAMAMOTO et S. MURANISHI. 1997. Chitosan capsules for colon-specific drug delivery - improvement of insulin absorption from the rat colon. *Pharm. Sci.* 86(9): 1016-1021.

WU, H.G., C.S. ECHT, M.P. POPP et J.M. DAVIS. 1997. Molecular cloning, structure and expression of an elicitor-inducible chitinase gene from pine trees. *Plant Molecular Biology*. 33(6): 979-987.

YAMASAKI, Y., I. FUKUMOTO, N. KUMAGAI, Y. OHTA, T. NAKAGAWA, M. KAWAMUKAI et HIDEYUKI MATSUDA. 1992. Continuous chitosan hydrolyzate production by immobilized chitosanolytic enzyme from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(10): 1546-1551

ZHANG, D.L. et P.C. QUANTICK. 1997 Effect of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*litchi chinensis sonn.*) fruit. *Postharvest Biology And Technology*. 12(2): 195-202.